

**Charakterisierung von Subpopulationen
humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen
im peripheren Blut**

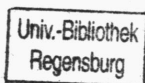
Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV
- Chemie und Pharmazie -
der Universität Regensburg



vorgelegt von
Christian Hirtreiter
aus Straßkirchen
2001

D10110211

86/VS 5075 H671



13816 777 ✓

Promotionsgesuch eingereicht am:

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. R. Andreesen

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender:	Prof. Dr. A. Merz
1. Prüfer (Erstgutachter):	Prof. Dr. E. v. Angerer
2. Prüfer (Zeitgutachter):	Prof. Dr. R. Andreesen
3. Prüfer:	Prof. Dr. M. Liefländer

Tag der mündlichen Prüfung:

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von

April 1997 bis April 2001

in der Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie

am Universitätsklinikum Regensburg.

Die externe Betreuung erfolgte durch Herrn Prof. Dr. R. Andreesen,

fakultätsintern wurde sie betreut durch Herrn Prof. Dr. E. v. Angerer

Inhaltsverzeichnis

A	EINFÜHRUNG.....	7
1	Die Hämatopoese	7
2	Stamm- und Vorläuferzellen	9
3	Kultivierung hämatopoetischer Zellen.....	13
4	Zytokine und Chemokine.....	15
5	Das Max.3-Antigen / CD84.....	16
6	Zielsetzung der Arbeit	18
B	MATERIAL UND METHODEN	19
1	Material.....	19
1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	19
1.2	Geräte	20
1.3	Zelllinien.....	21
1.4	Oligonukleotide.....	22
1.5	Standards und Kits	23
1.5.1	Molekulargewichtsstandards	23
1.5.2	Kits.....	23
1.6	Antikörper und Enzyme.....	23
1.6.1	Antikörper	23
1.6.2	Enzyme.....	25
1.7	Zytokine.....	25
1.8	Untersuchungsmaterial	25
2	Methoden	26
2.1	Zellkultur	26
2.2	Ficollisierung	28
2.3	Amplifikation von Genfragmenten.....	28
2.3.1	mRNA-Isolation und Reverse Transkription.....	29
2.3.2	mRNA-Isolation aus Einzelzellen und Reverse Transkription.....	31
2.3.3	Präamplifikation.....	33
2.3.4	PCR.....	34

Inhaltsverzeichnis

2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese (DNA).....	36
2.4	Durchflußzytometrie	37
2.4.1	Propidiumjodid	37
2.4.2	Kompensation der spektralen Überlappung	39
2.4.3	Durchflußzytometrische Messung für Oberflächenantigene	44
2.5	Laser Scanning Zytometrie.....	45
2.6	Zytochemische Methoden	45
2.6.1	Pappenheimfärbung	45
2.6.2	APAAP-Färbung von Zytospinpräparaten für den Eosinophilennachweis	46
3	Isolierung und Aufreinigung primärer Blutzellen.....	48
3.1	Gegenstromelutriation	49
3.2	Zellseparation: FACS und MACS	50
3.2.1	Die FACS-Sortiereinrichtung	50
3.2.2	Die MACS-Magnetische Zellsortierung	52
3.2.2.1	Aufreinigungsverfahren hämatopoetischer Vorläuferzellen	53
3.2.2.2	Linienpezifische Depletion mittels MACS	55
4	Flüssigkultur-Assays.....	56
4.1	Langzeitflüssigkulturen	56
4.1.1	Uniliniäre Differenzierungskulturen	56
4.1.2	CD84-Einfluß in Langzeitkulturen	57
4.2	Kurzzeitflüssigkultur	57
5	Colony-Assays.....	58
	Kolonietypen in Kultur von normalen humanen Blut- und Knochenmarkszellen.....	59
	Methylzellulose-Assay	59
5.1	Erythroide Kolonien.....	60
5.2	Granulopoetische Kolonien.....	62
5.3	Multi-lineage Kolonien	63
5.4	Megakaryozytäre Kolonien	63
5.4.1	Megakaryozyten-Assay	64
5.4.2	Erscheinungsbild der CFU-Mk	68
6	Langzeitkultur-Assays zur Detektion primitiver Vorläuferzellen (LTC-IC-Assay).....	69

Inhaltsverzeichnis

C	ERGEBNISSE	72
1	CD34-Subpopulationen.....	72
2	CD84 und Vorläuferzellen.....	74
2.1	CD84-Expression auf CD34 ⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen.....	74
2.2	Analyse der Oberflächenmarker CD34 ⁺ CD84 ⁺ Zellen.....	76
2.3	Klonogene Assays von CD34 ⁺ CD84 ⁺ oder CD34 ⁺ CD84 ⁻ Zellen.....	79
2.4	Langzeitkulturen von CD84 ⁺ und CD84 ⁻ Vorläuferzellen.....	80
2.4.1	LTC-IC-Frequenz in CD34 ⁺ CD84 ⁻ bzw. CD84 ⁺ CD34 ⁺ Vorläuferzellpopulationen.....	82
2.4.2	CD84-Expression bei <i>in vitro</i> Kultivierung	83
2.4.3	Blockierung von CD84 in Zellkulturen.....	85
3	Einfluß hemmender Faktoren auf die Hämatopoese.....	85
3.1	Untersuchung von Rezeptoren auf Einzelzellebene.....	85
3.2	Uniliniäre Differenzierung.....	88
3.2.1	Eosinophile.....	90
3.2.2	Mastzellen	92
3.2.3	Neutrophile.....	93
D	DISKUSSION	95
1	CD34-Subpopulationen.....	95
2	CD34 ⁺ Einzelzellen.....	101
3	CD84-Expression auf humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen.....	106
4	Uniliniäre Differenzierung und inhibierende Faktoren	111
E	ZUSAMMENFASSUNG	117
F	LITERATURVERZEICHNIS.....	119
G	ABKÜRZUNGEN.....	130

A Einführung

Am Anfang der Blutbildung (Hämatopoese) stehen pluripotente Stammzellen im Knochenmark, aus denen sich multi- und unipotenten Vorläuferzellen der unterschiedlichen Zellreihen bis hin zu den ausdifferenzierten Zellen im Blut mit ihren speziellen Funktionen entwickeln.

Eine Vielzahl von *in vitro* und xenochimären Transplantationsstudien hat gezeigt, daß frühe humane hämatopoetische Stammzellen CD34, ein Oberflächenprotein von noch unbekannter Funktion, exprimieren.

Die heterogene Population der CD34⁺ Zellen enthält frühe Vorläuferzellen der unterschiedlichen Zellreihen, hämatopoetische Progenitorzellen und pluripotenten, sich selbst erneuernden Stammzellen. Besondere Bedeutung erlangen diese Zellen in Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation, da nur pluripotente Stammzellen zur langfristigen Rekonstitution des hämatopoetischen Systems fähig sind (Keller *et al.*, 1992).

1 Die Hämatopoese

Alle Zellen des peripheren Blutes werden durch Zellteilung und Differenzierung aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen gebildet (Uchida *et al.*, 1993). Bei diesem komplexen Vorgang der Bildung und Entwicklung aller Blutzellen werden täglich 400 Milliarden Zellen produziert (Koller *et al.*, 1993). Aus pluripotenten Stammzellen entstehen die multipotenten lymphoiden oder myeloiden Progenitorzellen. Diese differenzieren dann weiter zu spezifischen Vorläuferzellen, die irreversibel dazu bestimmt sind nur einen oder wenige Typen von Blutzellen hervorzubringen (McAdams *et al.*, 1996).

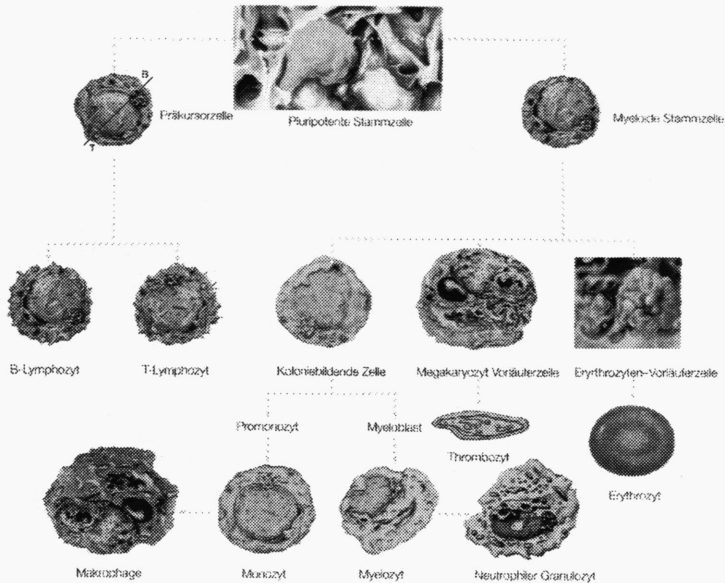


Abbildung 1

Stammbaum der Hämatopoese.

Alle zellulären Bestandteile des Blutes stammen von Mutterzellen im Knochenmark ab. Dieser kleine Zellpool bildet Tag für Tag die neuen Blutzellen (modifiziert nach Schering AG, 2000).

Die Proliferations- und Reifungsschritte der Vorläuferzellen im Knochenmark werden durch Zytokine speziell den „colony - stimulating - factors“ (CSF) stimuliert, die in bestimmten Reifungsstadien die Differenzierung zu den verschiedenen Zelllinien induzieren (Abbas *et al.*, 1996). Während dieser komplexen Differenzierung treten vielfältige morphologische und funktionelle Veränderungen auf.

Mediatoren solcher Vorgänge sind unter anderem Adhäsionsmoleküle, Zytokine, Chemokine, sowie andere Liganden und ihre Rezeptoren. Mit der Verfügbarkeit monoklonaler Antikörper gegen Zellstrukturen zeigte sich, daß die während der Zelldifferenzierung auftretenden Veränderungen im Phänotyp mit den von der Zelle differentiell exprimierten Strukturen, die von Antikörpern erkannt werden können, korrelieren (Abbas *et al.*, 1996). Da die differenzierungsabhängig exprimierten Moleküle das funktionelle Repertoire einer Zelle festlegen, kann eine funktionelle Charakterisierung sowohl von Antigenen als auch Zellen über Antikörper erfolgen. Diese „Marker“ werden

in verschiedene Kategorien zusammengefaßt. Hierbei kann die Expression sowohl vom Aktivierungszustand als auch vom Differenzierungsgrad abhängen, oder für bestimmte Linien oder Differenzierungswege der Zellen spezifisch sein. Bezogen auf Leukozyten wird ein Oberflächenmolekül, das einer bestimmten Zellpopulation oder einem bekannten Differenzierungsstadium zuzuordnen ist und mit einer Gruppe monoklonaler Antikörper reagiert, als Mitglied eines „cluster of differentiation“ (CD) bezeichnet. Bisher wurden über 250 CD beschrieben, wobei bei vielen weder Struktur noch Funktion völlig geklärt sind (7th Human Leucocyte Differentiation Antigen Workshop, Harrogate, Großbritannien, 2000).

2 Stamm- und Vorläuferzellen

Stammzellen werden über ihre Pluripotenz und ihre Selbsterneuerungskapazität definiert. Eine pluripotente Stammzelle ist in der Lage, sämtliche Zellen des hämatopoetischen Systems auszubilden. Durch die Selbsterneuerungskapazität wird der Pool von Stammzellen eines Menschen nie erschöpft. Die Proliferation und Reifung der Stammzellen erfolgt unter Einfluß eines komplexen Zytokinnetzwerks und von Adhäsionsmolekülen im Knochenmark.

Morphologisch sind diese Stammzellen von anderen unreifen Zellen der Hämatopoese nicht unterscheidbar. Lediglich mit Hilfe von Zellkultur-Assays können Stammzellen eindeutig nachgewiesen werden. Diese Colony-Assays weisen Stammzellen aufgrund ihrer Fähigkeit nach, hämatopoetische Zellklone zu bilden. Dazu werden mononukleäre Zellen kultiviert und nach festgelegten Zeitpunkten die gebildeten Zellklone gezählt. Als *in vitro* System zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit dient der colony forming cell - assay (CFC-Assay) in semisoliden Methylzellulose-haltigem Medium. Anhand dieses Assays können die Kolonien der einzelnen Zellreihen (BFU-E, CFU-M, CFU-GM, CFU-G, CFU-GEMM) nachgewiesen werden (McAdams *et al.*, 1996).

Im long-term culture initiating cell-Assay (LTC-IC-Assay) werden besonders frühe Vorläuferzellen und deren Koloniebildungsfähigkeit überprüft. Die bereits in eine Zellreihe differenzierten Vorläuferzellen gehen während des Assays (6 Wochen) zu Grunde, während die sehr frühen, weniger differenzierten Vorläuferzellen überleben. Nach 4 - 6

Wochen kann man im LTC-IC-Assay die sogenannten cobblestone area forming cells (CAFCs) nachweisen, die nach Überschichtung mit Methylzellulose und zusätzlichen 2 Wochen Inkubation zu den ihrer genetischen Bestimmung entsprechenden Kolonien auswachsen (McAdams *et al.*, 1996).

Kurzzeitkultursysteme sind nicht stammzellspezifisch, da sie nur Zellen auf der Ebene der geprägten Vorläuferzellen (CFU-GM, CFU-G, etc.) nachweisen.

Da die eigentlichen Stammzellen phänotypisch nicht charakterisiert bzw. isoliert werden können, behilft man sich indirekter Nachweismethoden. Ein indirekter *in vivo* Nachweis ist die Regeneration nach Transplantation von CD34⁺ Zellen in lethal bestrahlte immundefiziente Mäuse (NOD/SCID-Mäuse) (Whetton AD und Graham GJ, 1999).

Eine immunologische Differenzierung kann durch den Nachweis des CD34-Antigens erfolgen, welches auf unreifen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird.

Stamm- und Progenitorzellen können durch Oberflächenantigene oder funktionelle Untersuchungen von ausdifferenzierteren Stadien unterschieden werden. Sie exprimieren den Oberflächenmarker CD34 (Krause DS *et al.*, 1996). Die Durchflußzytometrie (siehe B 2.4.) macht sich die Expression des CD34-Antigens auf Stammzellen zunutze, welches mit fluorochrommarkierten monoklonalen CD34-Antikörpern nachgewiesen werden kann. Das CD34-Antigen hat eine hochglykosylierte, langgestreckte, mucin-ähnliche Struktur mit überwiegend extrazellulärem Anteil. Drei Epitope des CD34-Antigens werden aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Enzymen eingeteilt.

Epitop I wird durch Neuraminidase und die O-Sialo-Glykoprotease angegriffen, während Epitop II lediglich für Neuraminidase empfindlich ist. Epitop III hingegen ist unempfindlich für beide Enzyme. Die kommerziell auf dem Markt erhältlichen Antikörper haben allerdings unterschiedliche Qualität, was bei der Auswahl der Antikörper zu bedenken ist. Der Klon HPCA-2, der das Epitop II erkennt, zeichnet sich durch eine ausgezeichnete Auflösung aus. Die Klone Qbend-10, die das Epitop II erkennen und der das Epitop I erkennende HPCA-1-Klon eignen sich ebenfalls zum Nachweis CD34⁺ Zellen.

Allerdings ist dieses CD34-Antigen nicht nur auf Stammzellen zu finden, sondern auch auf determinierten Vorläuferzellen (CFU), so daß diese Nachweismethode ebenfalls nicht streng stammzellspezifisch ist (Uchida und Weissmann, 1992). In Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Vorläuferzellzahlen (= CD34⁺ Zellen) und die der Colony-Assays gut korrelieren (McAdams *et al.*, 1996; Graham *et al.*, 1997). Die nachfolgende Tabelle zeigt, wie die Vorläuferzellpopulationen durch die einzelnen Assays detektiert werden.

CD34-Bestimmung im FACS (2 h)	CD34 ⁺
Colony-Assays (2 Wochen)	BFU-E, CFU-E, -G, -M, -Mk, -GM, -GEMM
Long term culture assay (6 Wochen)	primitive Vorläuferzelle (LTC-IC)

Assays für die Detektion von Vorläuferzellen.

In vitro-Nachweissysteme von hämatopoetischen Vorläuferzellen. Neben immunologischen Nachweismethoden dienen teilweise aufwendige Zellkulturen zum Nachweis von hämatopoetischen Vorläuferzellen und unterschiedlichen Zellpopulationen.

Frühere Stadien, die Stammzellen enthalten, zeichnen sich zusätzlich durch folgende Oberflächenmarker aus: CD90 (Thy-1), KDR und die Abwesenheit von CD38 (Ziegler *et al.*, 1999).

Die gesamte Hämatopoese entsteht aus einzelnen pluripotenten Stammzellen, die sich durch ihre Selbsterneuerungskapazität auszeichnen. Diese Stammzellen tragen keine linienspezifischen Antigene und sind immunologisch durch die Expression des CD34-Antigens erfaßbar. Große Bedeutung kommen Stammzellen in der Therapie zu: die periphere Blut-Stammzell-Therapie ermöglicht toxische Hochdosistherapien solider Tumore oder hämatologischer Erkrankungen. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Stammzelltransplantationen erfolgreich durchgeführt. Neben der Behandlung hämatologischer und onkologischer Erkrankungen können so auch schwere immunologische Erkrankungen therapiert werden. Für eine autologe Knochenmarkstransplantation wird dem Patienten Knochenmark oder peripheres Blut nach Mobilisation zu einem Zeitpunkt entnommen, an dem kein Knochenmarksbefall durch seine Tumorerkrankung vorliegt. Bei einem Rezidiv der Erkrankung folgt eine Hochdosis-Chemotherapie und Ganzkörperbestrahlung, die noch vorhandenes Knochenmark und somit auch maligne Restzellen

zerstören. Nach dieser Behandlung wird dem Patienten das vorher entnommene Knochenmark über eine periphere Vene retransfundiert. Nach etwa zwei Wochen rekonstituiert sich das Knochenmark durch Ausreifung der im Transplantat befindlichen Stammzellen. Bis zu dieser Rekonstitution haben die Patienten eine herabgesetzte Immunabwehr und sind daher anfällig für Infektionen, die oft lebensbedrohlich verlaufen. Deshalb müssen sie in speziellen Isolierzimmern betreut werden.

Basis einer Stammzelltransplantation ist eine ausreichende Gewinnung von Stammzellen, wobei neben autologen Transplantationen auch allogene Spenden (Fremdspenden) möglich sind. Autologe Stammzellen werden weiterhin onkologisch Erkrankten supportiv transfundiert, um die Knochenmarkstoxizität einer Chemotherapie zu bekämpfen. Neben einer Dosissteigerung von Chemotherapeutika wird somit eine zeitgerechte Durchführung der Therapiezyklen möglich.

Während sich die Gewinnung von Stammzellen aus Nabelschnurblut sehr einfach gestaltet, setzt die Gewinnung von Blutstammzellen eine Behandlung mit Wachstumsfaktoren (bei autologen Transplantationen kombiniert mit Chemotherapie) voraus. Denn erst nach einer Wachstumsfaktorthherapie (z.B. G-CSF) werden diese Stammzellen in ausreichender Frequenz vom Knochenmark in das periphere Blut ausgeschwemmt, wobei der zugrunde liegende Mechanismus bisher nicht geklärt ist. Diese peripheren Blutstammzellen werden gesammelt und angereichert, indem sie als Bestandteil der mononukleären Zellen durch eine kontinuierliche Separation in einem extrakorporalen Kreislauf geerntet werden (Leukapherese).

Nach einer myeloablativen (d. h. knochenmarkszerstörenden) Chemotherapie werden die Stammzellkonzentrate dem Patienten reinfundiert (Stammzelltransplantation), innerhalb von etwa 12 Tagen erfolgt eine Rekonstitution seines Knochenmarks.

Für eine erfolgreiche Rekonstitution des Knochenmarks eines Patienten bei autologen Transplantationen sind mindestens 1×10^6 CD34⁺ Zellen pro Kilogramm Körpergewicht notwendig, bei allogenen Transplantationen werden mindestens 4×10^6 CD34⁺ Zellen pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers benötigt (Sutherland *et al.*, 1994; Messner, 1998).

Der Anteil CD34⁺ Zellen im Knochenmark liegt bei 0,5 bis 3 %. CD34⁺ Zellen im unstimulierten peripheren Blut sind mit einer Frequenz von 0,01 % bis 0,2 % nachweisbar. Im Nabelschnurblut Neugeborener findet sich ein Anteil von etwa 0,1 – 0,5 % (McAdams *et al.*, 1996; Sutherland DR *et al.*, 1994).

3 Kultivierung hämatopoetischer Zellen

Wachstumsfaktoren wie Zytokine und Chemokine regulieren durch Signaltransduktion die Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Zellen. *In vivo* werden sie u. a. von hämatopoetischen Zellen und Stromazellen gebildet.

Das Hauptorgan der Hämatopoese beim Erwachsenen ist das rote Knochenmark, das sich im wesentlichen auf die Knochen des Rumpfes, des Schädels und der proximalen Abschnitte der Extremitäten beschränkt. Das Gerüst des Knochenmarks mit seinen Fasern und den ortsständigen Zellen, das mit dem Blutgefäßsystem verbunden ist, bezeichnet man als Stroma. Die Stromazellen bilden Nischen, in denen die Hämatopoese durch Zell-Zell-Kontakte, Proteine der Extrazellulären Matrix und Bildung von Wachstumsfaktoren ermöglicht wird (McAdams *et al.*, 1996). Zu den Stromazellen zählen die Endothelzellen, die die Blutgefäße auskleiden und die Einwanderung der reifen Blutzellen in die Blutbahn regulieren, die Fibroblasten, die für die Bildung der Knochenmarkstruktur verantwortlich sind, die Fettzellen und die Makrophagen. Die Makrophagen bilden durch zellulären Kontakt mit den Erythrozyten sogenannte erythroide Inseln und sind so an deren Reifung beteiligt. Darüber hinaus entfernen sie, an die Endothelzellen angelagert, defekte Erythrozyten aus der Blutbahn (Mayani *et al.*, 1992).

Während bei der stroma-haltigen Kultivierung von hämatopoetischen Zellen, die Zytokine teilweise durch das Stroma gebildet werden, müssen sie bei der stroma-freien Kultivierung vollständig in definierter Menge und geeigneter Kombination zugefügt werden. Wichtige Zytokine sind z.B. IL-3, der Stammzellfaktor (SCF) und FLT-3 Ligand (FL).

IL-3 verhindert die Apoptose der linienspezifischen Vorläuferzellen, SCF und FL verhindern den programmierten Zelltod der frühen Vorläuferzellen (McAdams *et al.*, 1996). Durch Zugabe weiterer Zytokine können die Eigenschaften der kultivierten Zellen

beeinflusst werden. So wirkt z.B. Thrombopoietin (TPO) stimulierend auf die Linie der Megakaryozyten (Debili *et al.*, 1995). Während die oben genannten Zytokine einen induzierenden Einfluß haben, gibt es eine Reihe von Zytokinen, die sich inhibierend auf die Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Zellen auswirken. So kann beispielsweise die Zugabe von Transforming Growth Factor beta (TGF- β) die Vermehrung der Stamm- und Progenitorzellen vermindern.

Bei der Kultivierung der hämatopoetischen Zellen werden also zwei verschiedene Ansätze verfolgt (McAdams *et al.*, 1996):

- die stroma-haltige Kultur

Hierzu erfolgt eine Co-Kultivierung von hämatopoetischen Zellen und Stroma. Die Stromazellen generieren die zum Wachstum notwendigen Zytokine und die extrazelluläre Matrix.

- die stroma-freie Kultur

Hier werden die hämatopoetischen Zellen in Suspension kultiviert. Die für das Zellwachstum notwendigen Zytokine werden in definierter Menge und geeigneter Kombination hinzugegeben. Die Kultivierung erfolgt meist in Lochplatten unter Einsatz von aufgereinigten CD34⁺ Zellen (Collins *et al.*, 1996).

Für die klinische Anwendung werden die Zellen in luftdurchlässigen Kulturbeuteln kultiviert (Shapiro *et al.*, 1994).

Die Wahl des Mediums spielt für den Kultivierungserfolg eine große Rolle. Serumhaltige Medien haben den Vorteil, daß das in ihnen enthaltene Serum essentielle Nährstoffe, Hormone und Wachstumsfaktoren bereitstellt. Aus diesem Grund wurden große Anstrengungen unternommen, geeignete Cocktails für serum-freie Medien zur Kultivierung der hämatopoetischen Zellen zu entwickeln.

Für die unter *ex vivo* Bedingungen kultivierten hämatopoetischen Zellen gibt es folgende klinische Einsatzmöglichkeiten:

- Transplantation von blutbildenden Zellen nach erfolgter Hochdosis-Chemotherapie
- die somatische Gentherapie

- die Immuntherapie
- die Produktion von reifen Blutzellen

4 Zytokine und Chemokine

Zytokine sind eine heterogene Familie von Proteinmediatoren der natürlichen und der erworbenen Immunität, die oft von verschiedenen Zelltypen gebildet werden. Ein einzelnes Zytokin wirkt häufig auf verschiedene Zelltypen und übt seine regulatorischen Funktionen auf auto-, para- und/oder endokrinem Weg durch Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren aus (Abbas *et al.*, 1996).

Zytokine lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen:

- die Interleukine (IL-1 bis IL-18), deren Kernfunktion die Differenzierung, Aktivierung und Proliferation der Immunzellen ist,
- die Interferone (IFN) mit antiviraler und immunmodulierender Funktion,
- die koloniestimulierenden Faktoren (CSF) mit hauptsächlicher Wirkung auf die Differenzierung und Proliferation von hämatopoetischen Zellen
- und die Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF α , LT α und LT β), die als bedeutende Mediatoren der Immunantwort wirken.

Zytokine spielen mit ihren vielfältigen Wirkungsspektren bei verschiedenen physiologischen und pathologischen Situationen eine essentielle Rolle. Durch gegenseitige Aktivierung und Hemmung, sowie überlappende Funktionsbereiche sind sie eng miteinander verknüpft.

Chemokine sind 8 – 12 kDa große heparin-bindende Proteine, die eine Vielzahl biologischer Aktivitäten besitzen. Neben immunregulatorischen Funktionen, wichtigen Aufgaben bei der Wundheilung und der Regulation der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellproliferation üben sie aber auch suppressive Aktivitäten aus. Ursprünglich wurden sie für ihre Fähigkeit als „Chemotaktische Zytokine“ für reife Blutzelltypen benannt. Derzeit sind über 50 Chemokine in vier Subgruppen bekannt. Unterschieden werden sie durch das Vorhandensein von vier Cysteinen in hochkonservierten Positionen. Bei der

Gruppe der „CXC“-Chemokine sind die den N-Termini nächstgelegenen Aminosäuren durch eine einzelne beliebige Aminosäure (= „X“) getrennt. Im Gegensatz dazu sind die beiden Cysteine in der „CC“-Gruppe benachbart. Des weiteren sind die Chemokine in eine α -Subfamilie (CXC, CX₃C) und eine β -Subgruppe (C, CC) geteilt, deren Genloci auf unterschiedlichen Chromosomen liegen (Broxmeyer und Kim, 1999; Rollins, 1997).

In vielen Fällen haben die gleichen Chemokine mehrere Namen erhalten, da unterschiedliche Arbeitsgruppen das gleiche Chemokine nahezu gleichzeitig entdeckten. Die Chemokine vermitteln ihre Effekte durch Bindung an einen oder meist mehrere der 16 Chemokinrezeptoren.

5 Das Max.3-Antigen / CD84

Antigene oder markerspezifische monoklonale Antikörper dienen zur Beschreibung von Zellen. Einige sind spezifisch für Zellen bestimmter Linien oder Differenzierungswege, während die Expression anderer vom Aktivierungs- oder Differenzierungsgrad abhängt. Bezogen auf Leucozyten wird eine Oberflächenstruktur, die einer bestimmten Zellpopulation oder einem definierten Differenzierungsstatus zuzuordnen ist und mit einer Gruppe (cluster) monoklonaler Antikörper reagiert, als Mitglied eines „cluster of differentiation“ (CD) bezeichnet. Auch hämatopoetische Vorläuferzellen lassen sich anhand der Expression von Oberflächenantigenen unterscheiden. Viele Oberflächenantigene können auf verschiedenen Zelltypen detektiert werden und sind nicht linienspezifisch. Auf hämatopoetischen Zellen ist beispielsweise CD14 eines der wenigen linienspezifischen Differenzierungsantigene, welches von myeloiden Zellen exprimiert wird. Ebenso linienspezifisch sind die von den Max-Antikörpern erkannten Proteine, die teilweise bezüglich der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen reifungsassoziiert exprimiert werden (Andreesen *et al.*, 1986). Die monoklonalen Antikörper Max.1, Max.3 und Max.11 erkennen linienspezifische Antigene und mit zunehmendem Reifungsgrad nimmt deren Expression während der *in vitro* Differenzierung zu Makrophagen zu (Andreesen *et al.*, 1988). Anhand der Expression von Antigenen können *in vivo* Makrophagensubpopulationen definiert werden. So färben Max.1- und Max.11-Antikörper alle Arten von Makrophagen aus seriösen Körperhöhlen und

Flüssigkeiten, während gewebständige Makrophagen das Antigen in variablem Maße exprimieren (Andreesen *et al.*, 1998). Das Max.1/Max.11-Antigen wurde als Carboxypeptidase M identifiziert (Rehli *et al.*, 1995) und ermöglicht die Bestimmung von Subpopulationen anhand der unterschiedlichen Bindungseigenschaften der beiden Antikörper. Max.1 erkennt Carboxypeptidase M erst in einem späteren Differenzierungsstadium als Max.11. Es lassen sich also reifungsabhängige Proteinmodifikationen charakterisieren.

Auch für das Max.3-Antigen konnte eine für unterschiedliche Makrophagensubpopulationen charakteristische Expression *in vivo* festgestellt werden (Andreesen *et al.*, 1986). Mit dem Max.3-Antikörper lassen sich beispielsweise Peritonealmakrophagen anfärben, wohingegen das Max.3-Antigen auf Kupffer'schen Zellen nicht detektierbar ist. Der monoklonale Antikörper Max.3 weist eine höhere Linienspezifität als die Max.1/Max.11-Antikörper auf, die neben Makrophagen auch eine Reihe anderer Zellarten anfärben. Für Max.3 ist eine Kreuzreaktivität mit Megakaryozyten und Thrombozyten beschrieben (Andreesen *et al.*, 1986). Der Max.3-Antikörper erkennt auf Makrophagen ein Glykoprotein von 60 - 80 kDa. Nach enzymatischer Deglykosylierung beträgt das Molekulargewicht des Antigens 45 kDa. Auf Thrombozyten weist das Antigen ein Molekulargewicht von 58 - 62 kDa auf, welches nach Deglykosylierung ebenso auf 45 kDa abfällt.

In lektinaffinitätschromatographischen Versuchen und sequentiellen Deglykosylierungen mit Sialidase, N-Acetyl-Glukosaminidase, Galactosidase und Endoglykosidase H ließ sich eine unterschiedliche Glykosylierung des Antigens auf den verschiedenen Zelltypen nachweisen (Heinz, 1996). Auch für CD43 wurde ein ähnliches Verhalten beschrieben (Ellies *et al.*, 1994). Das weist vielleicht daraufhin, daß eine identische Proteinstruktur von verschiedenen Zellarten unterschiedlich glykosyliert wird. Der im Jahr 1985 klonierte monoklonale Antikörper Max.3 bindet und erkennt CD84 spezifisch (Krause SW *et al.*, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte CD84 erstmals auf hämatopoetischen Vorläuferzellen nachgewiesen werden.

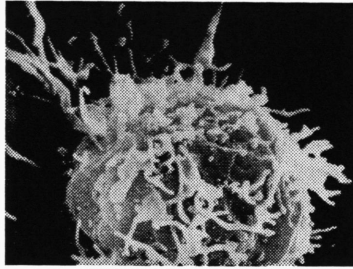


Abbildung 2

Eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer Blutvorläuferzelle. Die dargestellte Zelle zeigt einen Lymphozyten mit seiner komplexen Oberflächenstruktur und den charakteristischen Fortsätzen, den sog. Mikrovilli.

6 Zielsetzung der Arbeit

Die humane Hämatopoese wird durch stimulierende und inhibierende Faktoren reguliert. Die wichtigsten inhibierenden Faktoren sind TGF- β , IFN- γ und mehrere Chemokine, z.B. MIP-1 α . Diese Faktoren werden von Stromazellen, aber auch von den Vorläuferzellen selbst synthetisiert. Die Bedeutung der genannten Faktoren und ihrer Rezeptoren für frühe Vorläuferzellen und Stammzellen sollte analysiert werden. Da frühe Vorläufer- und Stammzellen aufgrund ihrer geringen Zahl im Knochenmark bzw. im peripheren Blut nur schwer in größeren Mengen zu isolieren sind, sollten die Untersuchungen auch auf Einzelzellebene durchgeführt werden. Das Expressionsmuster verschiedener Faktoren sollte ermittelt werden. Von besonderem Interesse sollten auch die uniliniären Differenzierungsmechanismen zu nicht mehr teilungsfähigen Effektorzellen sein. Ziel dieser Arbeit war, einen Beitrag zur Aufklärung der komplizierten Regulierung der Hämatopoese und der *in vitro* Expansion humaner hämatopoetischer Stammzellen zu liefern.

B Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Adhäsionsobjektträger Histobond	Paul Marienfeld KG, Bad Mergentheim
Amplifikationsgefäße (0,2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
CellGro® SCGM	CellGenix, Freiburg
Cytofunnel®	Shandon, Frankfurt a. M.
DMEM	StemCell Technologies, St. Katharinen
Einmalpipetten	Costar, Cambridge, USA
Ektachrome 64 T Film	Kodak
ELISA-Platten	Greiner, Nürtingen
Ficoll Separationslösung	Biochrom, Berlin; Pharmacia, Freiburg
Fötales Kälber-Serum (FCS)	Biochrom, Berlin
Glasdeckel (35 x 55 mm; 24 x 60 mm)	Engelbrecht, Edermünde
Hanks	Biochrom, Berlin
HLTM	StemCell Technologies, St. Katharinen
Humanserum Typ AB	PAN Systems, Aidenbach
IMDM	Gibco BRL, Eggenstein
Kryoröhrchen	Nunc, Naperville, USA
Kulturrkammern Lab-Tek®	Nunc, Naperville, USA
Liquemin® (Heparin-Lösung)	Roche, Mannheim
MikroAmp®-Reaktionsgefäße	Perkin Elmer, Weiterstadt
Mikroplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger (40 x 75 mm, 26 x 76 mm)	Engelbrecht, Edermünde; Shandon, Frankfurt a. M.;
	Paul Marienfeld KG, Bad Mergentheim;
	Menzeler & Glaser
	Biochrom, Berlin
	Greiner, Frickenhausen
PBS	
Petrischalen	
(100 x 15 mm; 35 x 10 mm)	
Pipettenspitzen (Standard, Filter)	Eppendorf, Hamburg
Polysin™ Glasobjektträger	Menzeler & Glaser
Polystyrolröhrchen für FACS	Falcon, Heidelberg;
	Becton Dickinson, Hamburg
Reaktionsgefäße (Safe-Lock)	Eppendorf, Hamburg
RNase freies Wasser	United States Biochemical, USA
RPMI 1640	Bio Witthaker, Verviers, Belgien
SeaKem® LE Agarose	FMC Bioproducts Europe, Dänemark
Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
Steriles Wasser	Braun, Melsungen

Sterilfilter	Millipore, Eschborn
Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Trypsin-EDTA-Lösung	Tecnomara, Fernwald
YG-Beads	Polysciences Europe, Eppelheim
Zellkulturflaschen	Costar, Cambridge, USA
Zellkulturplatten (6, 24, 96 Vertiefungen)	Falcon, Heidelberg; Greiner, Frickenhausen
Zellsieb (70µm)	Falcon, Heidelberg
Zellkulturschalen	Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50 ml, 225 ml)	Falcon Heidelberg

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Darmstadt und Sigma, Deisenhofen bezogen. Oligonukleotide wurden von der Firma Gibco BRL, Eggenstein synthetisiert.

1.2 Geräte

Autoklav	Tecnomara, Fernwald
Blutzellseparator CS 3000	Baxter Healthcare, Derrfield, USA
Brutschränke	Heraeus, Osterode
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoreseapparaturen:	
- Hoefer HE33	Pharmacia Biotech, Freiburg
- RAGE® RGX-100 System	Cascade Biologics Inc., USA
ELISA-Reader	MWG-Biotech, Ebersberg
ELISA-Waschgerät	Dynatech, Denkendorf
Färbetröge	Hellendahl
Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierer:	Becton Dickinson, Heidelberg
- FACScan	
- FACScalibur	
- FACStar ^{Plus}	
Gasbrenner	Tecnomara, Fernwald
Gefrierschränke (-80 °C)	Heraeus, Hanau
Gel-Dokumentationssystem	Intas, Göttingen
Heizplatte/Rührer	IKA Labortechnik, Staufen
Kühlschränke (+4 °C/-20 °C)	Liebherr, Biberach; Siemens, München
LSC	CompuCyte, MWG Biotech, Ebersberg
Magneten (MPC P-12, MPC E-1)	Dynal A. S., Oslo, Norwegen
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikroskope	Zeiss, Oberkochen; Leica, Wetzlar; Leitz, Heidelberg
Mikrowellenherd	Siemens, München; Privileg, Fürth

PCR-Thermocycler Progene	Techne, Cambridge, Großbritannien
PCR-Thermocycler GeneAmp	Perkin Elmer, Überlingen
PCR System 2400	
PCR-Thermocycler (Modell PTC-200)	MJ Research/Biometra, Oldendorf
pH-Meter	Knick, Berlin
Photokamera	Polaroid, Cambridge, USA
Pipetierhilfen (Pipetboy accu)	Tecnomara, Fernwald
Pumpe (Masterflex 701600)	Cole-Parmer, Chicago, USA
Spannungs- und Stromquellen	Bachhofer, Reutlingen
Spülmaschinen	Miele, Gütersloh
Sterilbank (Lamin Air HB 2448)	Heraeus, Osterode
Trockenschneeherstellungsrohr	Buse, München
VarioMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Vortex	Bender und Hobein, Heidolph
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Zählkammer nach Neubauer	Brandt Laborbedarf
Zentrifugen:	
- Cytospin3 Zytocentrifuge	Shandon, Frankfurt a. M.
- Elutriator J6-MC	Beckmann, München
- Megafuge 1.0 R	Heraeus, Osterode
- Minifuge T	Heraeus, Osterode
- PicoFuge™	Stratagene, Heidelberg
- Sigma 4K10	Heraeus, Osterode
- Ultrazentrifuge Optima L	Beckmann, München

1.3 Zelllinien

Caco-2	humane Darmadenokarzinomzelllinie (DSM ACC 169)
DOHH-2	humane B-Lymphomzelllinie (DSM ACC 47)
HEL	humane erythrozytische Leukämiezelllinie (DSM ACC 11)
Hela	humane Cervixkarzinomzelllinie (DSM ACC 57)
HL-60	humane akute myeloische Leukämiezelllinie (DSM ACC 3)
Jurkat	humane T-Lymphomzelllinie (Dr. R. Büttner, Regensburg)
KG-1	humane akute myeloische Leukämiezelllinie (DSM ACC 14)
K562	humane chronisch-myeloische Leukämiezelllinie (DSM ACC 10)
MonoMac-6	humane monozytische Leukämiezelllinie (DSM ACC 124)
M ₂ 10B ₄	murine Feederzellen, Terry Fox Labor, Vancouver, Kanada
SL/SL	murine Feederzellen, Terry Fox Labor, Vancouver, Kanada
THP-1	humane monozytische Leukämiezelllinie (DSM ACC 16)
U937	humane histiozytische Lymphomzelllinie (DSM ACC 5)

1.4 Oligonukleotide

PCR-Primerpaare

GEN	sense	antisense
CD38	5'-GTGGTCCATGTGATGCTCAA-3' 5'-GACACTAGAGGCCCTGGGTGA-3'	5'-GATGTGCAAGATGAATCCTCAG-3' 5'-CCAGCTCTTTTATGGTGGGA-3'
C-KIT	5'-TTTGGGAGCTGTCTCTTTAGG-3' 5'-CCACCTATCCTGGAATGC-3'	5'-CTCTGAAATCTGCTTCTCAATTAGC-3' 5'-TGAATGTTGGTCTTTTAGGGG-3'
β-actin	5'-AAGAGAGGCATCCTCACC-3' 5'-ATACCCCTCGTAGATGGG-3'	5'-TGAGGTAGTCAGTCAGGTCC-3' 5'-TACAATGAGCTGCGTGTG-3'
CD34	5'-GAGGCCACAACAAACATCAC-3' 5'-ACTCTTCTGGGCAGTCACAGAC-3'	5'-GCAGATGCCCTGAGTCAATT-3' 5'-CCACTCTCTGATGCCTGAAC-3'
IFN-γ	5'-TGACCAGAGCATCCAAAAGA-3' 5'-GAGATGACTTCGAAAAGCTG-3'	5'-CGCTTTTTCTCAGTCACG-3' 5'-GGTCGTCGATTTTGTCCCTT-3'
IFN-γR	5'-GGATTCCAGTTGTTGCTGCT-3' 5'-GCTCTTCACAGACCACCTCC-3'	5'-TTTTCTGGATTGTCTTCGG-3' 5'-GCTCTTCACAGACCACCTCC-3'
TGF-βRI	5'-AAATTGCTCGACGATGTTCC-3' 5'-GGCCAAATATCCCAACAGA-3'	5'-TTCCTGTTGACTGAGTTGCG-3' 5'-GCAATGCTGTAAGCCTAGCTG-3'
TGF-βRII	5'-GTGTGACTTTGGGCTTTCCTG-3' 5'-TAACAGTGGGCAGGTGGGAACT-3'	5'-CGCACCTTGGAACCAATGG-3' 5'-CCCAGTCATTACAGCAGATG-3'
TGF-βRIII	5'-CTGGACACCCTAACCGTGAT-3' 5'-CGTTTGACAGCCTTTGTGAT-3'	5'-CTGCCCTTGAGTAGCTGAG-3' 5'-ACTGCTGTTTTCCGAGGCT-3'
CCR1	5'-GTGGAAGCTGTTTCAGGCTC-3' 5'-GCTGTATTGCCCTTGTGG-3'	5'-CACACTCATGGGTGAACAGG-3' 5'-CAAACGGACAGCTTTGGATT-3'
CCR4	5'-GTGGGCTTTTACAGTGGCAT-3' 5'-ATGGGGTCATCACCAGTTTG-3'	5'-CACGTCGTGGAGTTGAGAGA-3' 5'-TTGCAGTAGGTATGGTTGCG-3'
CCR5	5'-TCTCTCTGGGCTCCCTACAA-3' 5'-CAGGATTCTTTGGCCTGAA-3'	5'-CAGATATTTCTGCTCCCA-3' 5'-CTGAACTTCTCCCGACAAA-3'
CD84	5'-CCTGAGGACCAAGAGCTGAC-3' 5'-AGCGTGCTGGCTATGTTCTT-3'	5'-CACCTTGGAGTCAGGATTT-3' 5'-GATTCTGGACTCTGCTGGCT-3'
MIP-1α	5'-GGCTCTCTGCAACCAGTTCT-3' 5'-CTGCTTCAGCTACACCTCCC-3'	5'-TTTCTGGACCCACTCCTCAC-3' 5'-ACTGCTGCCCCTGCTGTC-3'
TGF-β1	5'-AAGGGACAAATGTGAGTGCC-3' 5'-GACGCATGTATCCATTCAA-3'	5'-GCCTGGTTGAGCTTCTTTTG-3' 5'-CTGTTGGGCCATCAATTCTT-3'

Die Primersequenzen wurden mit dem Programm „Primer 3“ erstellt. Um Alu-Sequenzen zu vermeiden wurden mit den Programmen BLAST (Altschul *et al.*, 1997) und FASTA (HUSAR, Heidelberg; Pearsen und Lipmann, 1988) Sequenzvergleiche mit verschiedenen Datenbanken (GenBank, EMBL, DDBJ, PDB) durchgeführt.

1.5 Standards und Kits

1.5.1 Molekulargewichtsstandards

- DNA molecular-weight marker V, DIG-labeled, (Boehringer, Mannheim)
Fragmentlänge (bp):
587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80, 64, 57, 51, 21, 18, 11
- Φ X174RF DNA/*Hae* III Fragments (Gibco BRL, Eggenstein)
Fragmentlänge (bp):
1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72
- 1 KB Plus DNA Ladder™ (Gibco BRL, Eggenstein)
Fragmentlänge (bp):
12000, 5000, 2000, 1650, 1000, 850, 650, 500, 400, 300, 200, 100

1.5.2 Kits

CD34 ⁺ Isolierungskit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Dynabeads® mRNA DIRECT™ Kit	Dynal A. S., Oslo, Norwegen
MegaCult™ Kit	StemCell Technologies, St. Katharinen
MethoCult™ H4434 Kit	StemCell Technologies, St. Katharinen
Mycoplasma Detection Kit	Boehringer, Mannheim

1.6 Antikörper und Enzyme

1.6.1 Antikörper

Monoklonale Antikörper (Klon):

Maus-anti-human:

CD3 (sk7)	Becton Dickinson, Hamburg
CD10 (ALB2)	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD11c (BU15)	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD14 (MHCD14)	Caltag, Burlingame, USA
CD15 (MMA)	Becton Dickinson, Hamburg
CD16 (M1604)	CBL, Amsterdam, Holland
CD17 (G035)	PharMingen, Hamburg
CD19 (4G7)	Becton Dickinson, Hamburg
CD25 (3G10)	Caltag, Burlingame, USA
CD32 (AT10)	Serotec, Biozol, Eching
CD34 (581)	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD34 (HPCA-2)	Becton Dickinson, Hamburg
CD34 Pool	Immunotech, Marseille, Frankreich
(Qbend-10, Immu-133, Immu-409)	
CD38 (HIT2)	Caltag, Burlingame, USA

CD41a (HIP8)	PharMingen, Hamburg
CD45 (2D1)	Becton Dickinson, Hamburg
CD49d (44H6)	CBL, Amsterdam, Holland
CD64 (22)	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD71 (Lo1.1.)	Becton Dickinson, Hamburg
CD105 (266)	PharMingen, Hamburg
CD117 (104D2)	Caltag, Burlingame, USA
CD119 (MCA 1450)	Serotec, Biozol, Eching
CCR5 (2D7)	PharMingen, Hamburg
HLA-DR (L243)	Becton Dickinson, Hamburg
MAX-Antikörper	eigene Arbeitsgruppe
Taq Start-Antibody	Clontech, Heidelberg
Ziege-anti-Maus APC	Caltag, Burlingame, USA
Ziege-anti-Maus FITC	Becton Dickinson, Hamburg
Ziege-anti-human IgE	Serotec, Biozol, Eching

Isotypen:

IgG gesamt	Immunotech, Marseille, Frankreich
IgG ₁	Becton Dickinson, Hamburg

An magnetische Microbeads gekoppelte monoklonale Maus-anti-human Antikörper:

CD2 (RPA-2.10)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD14	
CD15	
CD19	
CD33 (P67.6)	
CD34 (Qbend-10)	
CD45RA (L48)	
CD56 (NCAM 162)	
CD61 (Y2/51)	

Neutralisierende Antikörper:

Anti-human-MIP-1 α	PeproTech, London
Anti-human-TGF- β 1	R & D Systems, Wiesbaden
Anti-human-IFN- γ (NIB42)	PharMingen, Hamburg

Polyklonale Antikörper und Kopplungsreagenzien:

Streptavidin-Peroxidase	Dianova, Hamburg
Streptavidin-Alkalische Phosphatase	Dianova, Hamburg

1.6.2 Enzyme

AmpliTa TM	Perkin Elmer, Überlingen
DNase I	Roche, Mannheim
High Fidelity Taq DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Reverse Transkriptase SuperScript TM II	Gibco BRL, Eggenstein
Recombinanter RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega, Madison, USA
Taq DNA-Polymerase	Roche, Mannheim

1.7 Zytokine

G-CSF	PeproTech, London
GM-CSF	Sandoz AG, Nürnberg
FLT-3L	PeproTech, London
IFN- γ	Dr. Rentschler Biotechnologie, Laupheim
IL-3	Sandoz AG, Nürnberg
IL-5	PeproTech, London
IL-6	Cangene, USA
MIP-1 α	PeproTech, London
Stem Cell Factor	R & D Systems, Wiesbaden
TGF- β 1	PeproTech, London
TPO	PeproTech, London

1.8 Untersuchungsmaterial

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden mittels Leukapherese von unbehandelten gesunden Spendern oder von tiefgefrorenen nicht verwendeten Leukaphereseprodukten von Patienten mit soliden Tumoren nach Mobilisation mit Chemotherapie und G-CSF-Behandlung erhalten. Knochenmarkszellen stammen von Knochenmarksaspiraten von gesunden Individuen, die für eine allogene Knochenmarkstransplantation spendeten. Nabelschnurblut wurde von Nabelschnüren gesund geborener Neugeborener erhalten. Das schriftliche Einverständnis der Patienten, der Zellspender bzw. der Eltern der Neugeborenen lag jeweils vor. Mononukleäre Zellen wurden mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation und in einigen Experimenten mittels Gegenstromelutration um Plättchen und große Monozyten von der Lymphozytenfraktion abzutrennen gewonnen (Brugger *et al.*, 1991). Nach Separation wurden die Elutiationsfraktionen „57 ml/min bis 111 ml/min“ gemäß ihrer Volumina gepoolt. Die resultierenden mononukleären Zellen enthielten die Mehrheit aller CD34⁺ Zellen.

2 Methoden

2.1 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden in einem Brutschrank (Heraeus, Osterode) inkubiert, dessen Einstellung eine Atmosphäre von 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit gewährleistet.

Diese Zellen wurden in RPMI 1640-Medium unter Zusatz von 50 ng/ml 2-Mercaptoethanol geführt und zweimal wöchentlich 1 : 20 geteilt.

Adhärenente Zellkulturen bewachsen eine Oberfläche meist nur bis zur Konfluenz; dabei tritt nach Ausbildung eines Monolayers eine Wachstumsinhibierung ein. Zur Erhaltung einer hohen Viabilität müssen diese Zellen nicht nur mit frischem Medium überschichtet, sondern vor dem Erreichen der Konfluenz verdünnt werden. Dazu zieht man zunächst den Kulturüberstand ab, wäscht die adhärenenten Zellen mit PBS, inkubiert sie 30 Sekunden mit Trypsin-EDTA-Lösung und löst diese nach 3 Minuten durch Klopfen ab. Eine vollständige Ablösung der trypsinisierten Zellen wird mechanisch durch einen Schlag der Flasche gegen eine solide Oberfläche erreicht. Die Zellaggregate werden dann durch die Scherkräfte vereinzelt, die beim Auf- und Abpipettieren der Suspension durch eine senkrecht auf den Boden der Kulturflasche gestellte 5 ml Meßpipette auftreten. Die Zugabe von FCS-haltigem Medium beendet danach die Trypsinierung der Zellen, die entsprechend verdünnt in neue Kulturgefäße passagiert werden.

Für die Stimulierung von Zelllinien wird dem Zellmedium 12 Stunden PMA 50 ng/ml, Cycloheximid 10 µg/ml und PHA-P 1 µg/ml zugesetzt.

Trypsin-EDTA-Lösung:

Trypsin	0,05 %
EDTA	0,02 %
in PBS	

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):

NaCl	150 mM
K ₂ HPO ₄	8 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
in Millipore-Wasser auf pH 7,3 einstellen	

Zellkulturmedium:

RPMI 1640 (Bio Witthaker)	
Fötale Kälber-Serum (FCS)	10 %
Penicillin (Gibco BRL)	100 U/ml
Streptomycin (Gibco BRL)	100 U/ml
Na-Pyruvat	1 mM

Die Komplementaktivität im verwendeten FCS wurde vor Verwendung durch Erhitzung beseitigt (30 min, 56 °C). Dem Kulturmedium wurde als Antibiotikum Penicillin/Streptomycin zugesetzt.

Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Bestimmung von Zellzahlen und die Untersuchung von Zellen erfolgte mittels Trypanblau-Ausschlußtest, der auf dem Prinzip basiert, daß Trypanblau von toten, aber nicht von lebenden Zellen aufgenommen wird.

Dazu wurde die Zellsuspension je nach Zelldichte 1 : 2 bis 1 : 10 mit Trypanblaulösung verdünnt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben, wobei die Zellzahl innerhalb der 16 Zählquadrate zwischen 25 und 250 liegen sollte.

Trypanblaulösung:

Trypanblau	0,15 %
NaCl	150 mM
in PBS	

Berechnung der Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension:

Zellkonzentration = Zellzahl innerhalb der 16 Quadrate x Verdünnungsfaktor x 10^4

Einfrieren und Auftauen der Zellen

Exponentiell wachsende Zellen wurden mit RPMI-Medium gewaschen, gezählt und auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (1200 Upm, 5 Minuten) und mit eiskaltem Einfriermedium in derselben Konzentration aufgenommen.

Die Zellsuspension wurde in 1 ml Portionen in Einfrierröhrchen aliquotiert und sofort in einem Styroporbehälter bei -70 °C eingefroren. Nach einem Tag wurden die Röhrchen für die Langzeitlagerung in einen Flüssigstickstofftank überführt.

Einfriermedium:

Kulturmedium	70 %
FCS	20 %
DMSO	10 %

Beim Auftauen von Zellen wurden die Einfrieröhrchen aus dem Stickstofftank bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und sofort in 37 °C warmes Kulturmedium überführt. Nach 5 h wurde das Kulturmedium gewechselt, um das zelltoxische DMSO zu entfernen.

Mykoplasmen-Test

Um sicherzustellen, daß die Zelllinien nicht mit Mykoplasmen kontaminiert waren, wurde in regelmäßigen Abständen ein Mykoplasmen-Test (Mycoplasma Detection Kit, Boehringer, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2 Ficollisierung

10 ml heparinisiertes Vollblut (Nabelschnurblut oder Leukapheresat) werden mit 25 ml PBS vermischt und dann langsam an der Gefäßwand eines 15 ml Ficoll (Biochrom, Berlin; Dichte 1,077) enthaltenden 50 ml Röhrchens hinunterlaufengelassen. Nach Zentrifugation (1500 Upm, 18 °C, 45 min ungebremst) wird die Interphase (weißer Saum zwischen den Schichten) vorsichtig mit einer 2 ml Pipette abgenommen. Diese Zellsuspension wird mit 10 ml PBS / 10 % AB gewaschen (1200 Upm, 10 min) und das Zellpellet in 2 ml PBS / 10 % AB resuspendiert. Nach Zellzählung wird die Zellzahl entsprechend der Weiterverarbeitung eingestellt.

2.3 Amplifikation von Genfragmenten

Durch die „polymerase chain reaction“ (PCR) kann in kurzer Zeit ein DNA-Fragment amplifiziert werden.

Mit Hilfe der PCR lassen sich also unter Verwendung zweier entgegengesetzt orientierter genspezifischer Primer DNA-Fragmente definierter Länge und Sequenz anreichern (Mullis *et al.*, 1986).

Dazu wird die DNA-Doppelhelix durch Erhitzen in ihre zwei Stränge aufgeschmolzen. Sense- und antisense-Primer binden nach Erreichen einer tieferen Temperatur

(„annealing“-Temperatur) an den entsprechenden DNA-Strang. Das freie 3'-OH-Ende dieser spezifischen Oligonukleotide wird von der Taq-Polymerase mit Nukleotiden komplementär verlängert (Elongation): Eine PCR läuft in mehreren Zyklen ab, in denen die Schritte Aufschmelzen, Annealing und Elongation wiederholt werden. Da neupolymerisierte DNA in jedem der darauf folgenden Schritte als neue Matrize verwendet wird, steigt die Zahl der durch sense- und antisense-Primer determinierten Fragmente exponentielle mit jedem Zyklus.

Nach vorhergehender Reverser Transkription der zellulären mRNA in cDNA läßt sich die RNA der jeweiligen Zielzelle analysieren.

2.3.1 mRNA-Isolation und Reverse Transkription

Mittels der Dynabeads biomagnetischen Separation (Dynal A. S., Oslo, Norwegen) wird die mRNA von einzelnen gesorteten Zellen bzw. Zelllinien isoliert und weiterverarbeitet. Die an eine Beadoberfläche gebundene Oligo (dT)₂₅ wird sowohl zum Anhaften der mRNA als auch als Primer für die Reverse Transkriptase bei der first strand cDNA verwendet. Ohne vorherige RNA-Aufreinigungsschritte wird die direkte PolyA⁺ RNA-Isolation durchgeführt.

Reagenzien:

Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (5 mg/ml; $3,3 \times 10^8$ Beads/ml)

Die 2,8 µm großen Oligo (dT)₂₅ Beads werden in einer phosphat-gepufferten Lösung (pH 7,4) aufbewahrt:

NaCl	137 mM
KCl	2,77 mM
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	4,3 mM
KH ₂ PO ₄	1,4 mM
NaN ₃	0,02 %
in aqua bidest.	

Elutionspuffer:

10 mM Tris/HCl pH 7,5

Regenerationspuffer:

0,1 M NaOH

Lyse-/Bindungspuffer:

Tris/HCl pH 7,5	100 mM
LiCl	500 mM
EDTA pH 8	10 mM
LiDS	1 %
DTT	5 mM
in aqua bidest.	

Waschpuffer A:

Tris/HCl pH 7,5	10 mM
LiCl	0,15 mM
EDTA	1 mM
LiDS	0,1 %
in aqua bidest.	

Waschpuffer B:

Tris/HCl pH 7,5	10 mM
LiCl	0,15 M
EDTA	1 mM
in aqua bidest.	

Um die mRNA von 10^6 Zellen zu isolieren werden die in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit PBS (1200 Upm, 10 min) gewaschenen Zellen mit 250 μ l Lyse-/Bindungspuffer versetzt. Aufgrund der freigesetzten DNA wird das Gemisch viskose. Mit einer 1 ml-Spritze wird das Gemisch unter dreimaligem Auf- und Abpipettieren durch eine feine 0,2 mm Kanüle geschert. 80 μ l der Dynabeadsuspension werden in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß in den Magnetischen Partikelkonzentrator (MPC E-1) nach dem Anhaften der Beads an der Gefäßwand und dem Verwerfen des Überstands in 80 μ l Lyse-/Bindungspuffer resuspendiert (= Magnetischer Waschvorgang). Diese Suspension wird auf die Zellsuspension gegeben und unter häufigem Mischen (Vortex) bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Nach zweimaligen Durchführen des Magnetischen Waschvorgangs mit je 100 μ l Waschpuffer A und dreimaligem Waschen mit 100 μ l Waschpuffer B ist die mRNA der Zellen an die Beads gekoppelt. Nach dem Verwerfen des Überstandes werden die Beads mit 10 μ l Elutionspuffer versetzt. Das geschlossene Reaktionsgefäß wird 2 min in das 65 °C heiße Wasserbad gestellt. Sodann wird das Reaktionsgefäß wieder auf dem Magneten (MPC E-1) der magnetischen Separation unterzogen. Man überführt den Überstand mit der gelösten mRNA in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß. Die Beads können mit einem Regenerationspuffer regeneriert werden und können mehrmals verwendet werden. Die 10 μ l mRNA-Suspen-

sion wird mit 1 µl Oligo (dT)₂₅ (500 µl/ml) und 1 µl RNase-freiem Wasser versetzt, 10 min bei 70 °C inkubiert, anschließend kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt.

Master-Mix:

4 µl	5x1 st Strand Buffer	Gibco BRL, Eggenstein
2 µl	DTT (1 mM)	Gibco BRL, Eggenstein
1 µl	dNTP's (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; je 10 mM)	Boehringer, Mannheim

Der Master-Mix wird zu den 12 µl gegeben und 2 min gemischt (Vortex). Nach der Zugabe von 1 µl SuperScript™ II (Gibco BRL, Eggenstein) wird das Reaktionsgefäß 60 min (42 °C) und 15 min (70 °C) inkubiert. Die erhaltene cDNA-Suspension wird runterzentrifugiert und in verschiedenen Verdünnungen (mit RNase-freiem Wasser verdünnt) aliquotiert bei -20°C gelagert.

2.3.2 mRNA-Isolation aus Einzelzellen und Reverse Transkription

Die 0,5 ml-Reaktionsgefäße mit den FACStar^{Plus}-gesorteten Einzelzellen (siehe B 3.2.1) werden auf Trockeneis gestellt. 120 µl Dynabeadsuspension werden in ein neues 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 200 µl Lyse-/Bindungspuffer versetzt. Nach 30 Sekunden auf dem MPC wird der Überstand verworfen. Die Beads werden in 240 µl Lyse-/Bindungspuffer resuspendiert. In jedes mit einer Einzelzelle bestücktes Reaktionsgefäß werden 20 µl Beadsuspension gegeben und 10 min unter häufigem mischen (Vortex) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden diese Reaktionsgefäße 2 min in den MPC P-12 gestellt und der Überstand verworfen. Nach dem Durchführen des Magnetischen Waschvorgangs mit 100 µl Waschpuffer A und anschließend mit 100 µl Waschpuffer B wird der Überstand verworfen. In jedem Reaktionsgefäß befinden sich die Beads mit angekoppelter RNA. Auf die Beads wird jeweils 40 µl 5x1st Strand Puffer gegeben. Den Puffer verwirft man nach dem Mischen und der magnetischen Separation mittels MPC P-12. Sofort wird ein Mix in jedes Reaktionsgefäß gegeben und nach kurzem mischen (Vortex) erfolgt eine Inkubation: 60 min (42 °C), 2 min (95 °C) und 4 °C (∞).

Mix:

4 µl	5x1 st Strand Puffer	Gibco BRL, Eggenstein
2 µl	DTT (1 mM)	Gibco BRL, Eggenstein
1 µl	dNTP's (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; je 10 mM)	Boehringer, Mannheim
1 µl	SuperScript TM II RT	Gibco BRL, Eggenstein
0,5 µl	RNase Inhibitor	Promega, Madison, USA
11,5 µl	RNase-freies H ₂ O	USB, USA
Gesamt: 20 µl		

Alle Enzyme werden bei -20 °C gelagert und bei Entnahme ebenfalls gekühlt. Steriles Arbeiten in räumlicher Trennung von PCR-Produkten mit gestopften neuen Spitzen für PCR und mit sterilisierten Reaktionsgefäßen ist zur Vermeidung von Kontaminationen bei dieser empfindlichen Methode erforderlich. Als Negativkontrolle dient ein Parallelansatz ohne RNA.

Die Anzahl dieser Zyklen beträgt etwa 40. Terminal kann eine Phase von 5 min bei 72 °C angefügt werden um die Länge der PCR-Fragmente auszugleichen (terminal extension). Da die günstigste annealing-Temperatur eines Primerpaares nicht immer eindeutig zu ermitteln ist, kann die zweite Temperatur des Zyklus fortschreitend heruntergeregt werden (touch down z.B.: 0,5 °C /Zyklus). Dadurch sind die bestmöglichen Bedingungen zumindest in einem Reaktionsschritt gewährleistet, dessen Produkt in den folgenden Zyklen amplifiziert wird. Die Analyse der gewonnenen PCR-Produkte erfolgt in einem Agarosegel.

Nach der Resuspension der Beads in 50 µl TE-Puffer werden die Reaktionsgefäße bei -20 °C gelagert.

TE-Puffer pH 8:

10 mM	Tris
1 mM	EDTA
in RNase-freiem H ₂ O	

10x PCR-Puffer:

3,73 g	KCl
1,21 g	Tris
in 100 ml DEPC-H ₂ O lösen und pH einstellen	

Einzelzell-Polymerase-chain-reaction (PCR)

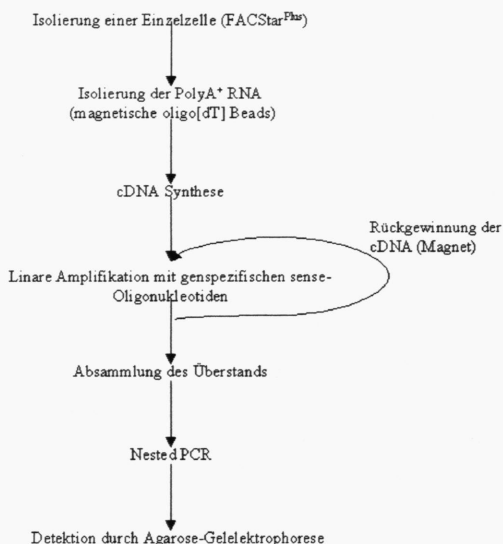


Abbildung 3

Einzelzell-PCR zur Amplifikation von Genfragmenten aus hämatopoetischen Vorläuferzellen

2.3.3 Präamplifikation

In einer „Voramplifikation“ wird mit einer Mischung aus mehreren genspezifischen sense-Primer die an die magnetischen Partikel gebundene cDNA linear amplifiziert. Die hierbei amplifizierte Zweitstrang-cDNA wird in einem Magnet von der an die Dyna-beads gebundenen cDNA getrennt. Jeweils 4 µl aus dem Überstand der Zweitstrang-cDNA wird anschließend zur nested-PCR verwendet. Alle Präamplifikationslösungen werden in einem wie folgt zusammengesetzten Reaktionsvolumen inkubiert:

96 °C	2 min	} 20 Zyklen
96 °C	30 s	
60 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	3 min	
4 °C	∞	

Mix:

13,75 - n x 0,5 µl	RNase-freies H ₂ O	USB, USA
2,5 µl	10x Puffer pH 8,6; 8,9; 9,2	
2 µl	MgCl ₂ (25 mM)	Gibo BRL, Eggenstein
0,5 µl	Oligonucleotid sense (20 µM)	Gibco BRL, Eggenstein
0,5 µl	Oligonucleotid sense (20 µM)	} n Gibco BRL, Eggenstein
0,5 µl	dNTP's (40 mM)	
0,25 µl	1 : 1-Gemisch AmpliTaq® +	
	Taq Start Antikörper	Boehringer, Mannheim
		Perkin Elmer, Überlingen
		Clontech, Heidelberg

Gesamt: 20 µl

Diese Suspension wird auf die mit TE-Puffer gewaschenen Beads der Einzelzellen (siehe B 3.2.1) gegeben. Als Negativkontrolle wird die Lösung in ein leeres Reagenzglas pipettiert. Nach der Durchführung der Amplifikationsreaktion wird der Überstand aufbewahrt und die Beads werden mit 50 µl TE-Puffer gewaschen. Nach Resuspension der Beads in 50 µl werden die Reaktionsgefäße bei -20 °C gelagert.

2.3.4 PCR

4 µl dieser Präamplifikationsproduktsuspension werden in einer nested-PCR eingesetzt (s. o.). Die optimalen Bedingungen (pH, MgCl₂-Konzentrationen) für die synthetisierten sense- und antisense-Oligonukleotide (Gibco BRL, Eggenstein) werden zuvor für jedes Primerpaar mittels geeigneter Zelllinien bestimmt und entsprechend im folgenden verwendet. Es werden immer Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Als Reaktionsgefäße finden MikroAmp® autoklavierte Reaktionsgefäße mit Deckel (Perkin Elmer, Überlingen) und Multiply-µStrip-0,2 ml dünnwandige Amplifikationsgefäßketten mit Deckeln (Sarstedt, Nümbrecht) Verwendung.

I. Runde:

15,25 µl	RNase-freies H ₂ O	USB, USA
2,5 µl	10x Puffer pH 8,6; 8,9; 9,2	
1,5 µl	MgCl ₂ (25 mM)	Gibo BRL, Eggenstein
0,5 µl	Oligonucleotid sense (20 µM)	Gibco BRL, Eggenstein
0,5 µl	Oligonucleotid antisense (20 µM)	Gibco BRL, Eggenstein
0,5 µl	dNTP's (40 mM)	Boehringer, Mannheim
0,25 µl	1 : 1-Gemisch AmpliTaq® +	Perkin Elmer, Überlingen
	Taq Start Antikörper	Clontech, Heidelberg
4 µl	Präamplifikationsüberstand (s. o.)	
Gesamt: 25 µl		

Es erfolgt eine PCR-Reaktion mit touch down:

td55

1.	96 °C	2 min		
2.	96 °C	20 s	}	10 x
	60 °C - 55 °C	20 s		
	72 °C	20 s		
3.	96 °C	20 s	}	30 x
	55 °C	20 s		
	72 °C	20 s		
4.	72 °C	3 min		
	4 °C	∞		

0,5 µl dieses Amplifikats werden in einer zweiten PCR-Reaktion (II. Runde) mit dem passenden *inneren Primerpaar* des jeweiligen Gens bei optimierten Bedingungen eingesetzt.

II. Runde:

18,75 µl	RNase-freies H ₂ O	USB, USA
2,5 µl	10x Puffer pH 8,6; 8,9; 9,2	
1,5 µl	MgCl ₂ (25 mM)	Gibco BRL, Eggenstein
0,5 µl	<i>Oligonucleotid sense</i> (20 µM)	Gibco BRL, Eggenstein
0,5 µl	<i>Oligonucleotid antisense</i> (20 µM)	Gibco BRL, Eggenstein
0,5 µl	dNTP's (40 mM)	Boehringer, Mannheim
0,25 µl	1 : 1-Gemisch AmpliTaq® + Taq Start Antikörper	Perkin Elmer, Überlingen Clontech, Heidelberg
0,5 µl	Amplifikationsprodukt aus I. Runde	
Gesamt: 25 µl		

Alternativ wird folgender Mix verwendet (*Endkonzentration*):

40,6 µl	H ₂ O	USB, USA
6 µl	10x Puffer pH 8,9 (1x)	
6 µl	MgCl ₂ (2,5 mM)	Gibco BRL, Eggenstein
3 µl	DMSO (5 %)	Merck, Darmstadt
2,4 µl	15mer Random Primer (10 µM)	MWG Biotech, Ebersberg
0,6 µl	dNTP's (0,1 mM)	Boehringer, Mannheim
1,4 µl	Taq von Perkin Elmer	Perkin Elmer, Überlingen
Gesamt: 60 µl		

Dieser Mix wird auf die vorher gewaschenen Beads gegeben und wie folgt inkubiert..

94 °C	2 min	}	50 Zyklen
94 °C	45 s		
28 °C	45 s		
55 °C	45 s		
68 °C	15 min		
4 °C	24 h		

Die unspezifisch amplifizierte cDNA (60 µl) wird bei -20 °C gelagert.

Die Beads werden mit 50 µl TE-Puffer gewaschen und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert und ebenso bei -20 °C bis zur Wiederverwendung gelagert.

3 µl unspezifisch amplifizierte cDNA werden in der I. und II. Runde (siehe oben) zum Nachweis eines Zytokins bzw. Zytokinrezeptors verwendet. Entsprechend wird dann die H₂O-Menge angepaßt.

Die einzelnen Amplifikationsprodukte werden in einem 3 %-igen Agarosegel aufgetrennt und fotografiert.

2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese (DNA)

Die PCR-Produkte wurden in einem 3 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Da DNA durch die Phosphatgruppen stark negativ geladen ist, wandert sie bei der Gelelektrophorese in einem elektrischen Feld zur Anode und zwar um so schneller je kleiner die Fragmente sind. Zum Auftrennen von DNA werden abhängig von der Größe der Fragmente 0,8 – 3 %-ige Agarosegele verwendet.

Die in TAE-Puffer gelöste Agarose (Gesamtvolumen ca. 150 ml) wurde im Mikrowellenherd aufgekocht und anschließend nach Zugabe von 0,05 µl/ml Ethidiumbromid (Stocklösung: 10 mg/ml) – auf ca. 60 °C abgekühlt – in die Gelelektrophoreseapparatur gegossen. Nach Festwerden des Gels, dem die Übersichtung mit Elektrophoresepuffer (TAE-Puffer) folgte, wurden die mit 1/5 Volumen Auftragspuffer versetzten Proben (ca. 0,5 µg DNA für analytische Zwecke) in die ca. 20 µl großen Geltaschen pipettiert. Als DNA-Längenstandard wurde 1 µg von dem DNA Längenstandard V Digoxigeninmarkiert, ein Fragmentgemisch aus der Spaltung von pBR 322-DNA mit der Restriktionsendonuclease Hae III, verwendet. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 V und einer Stunde Dauer durchgeführt. Das in die DNA eingelagerte Ethidium-

bromid ermöglichte nach Anregung auf einem UV-Schirm bei 254 nm das Sichtbarmachen der DNA. Das Bandenmuster wurde photographisch mit einer Sofortbildkamera festgehalten.

50x TAE-Puffer (pH 7,8):

Tris-Base	242 g/l
CH ₃ COOH (konz.)	57,1 ml/l
EDTA (pH 8,0) / 100 ml pro Liter	0,5 M
zur Verwendung 1:50 in aqua bidest. Verdünnt	

5x DNA-Ladepuffer:

Tris/HCl	50 mM
EDTA	50 mM
Glycerin	40 %
SDS	1 %
Bromphenolbau in aqua bidest.	0,1 %

2.4 Durchflußzytometrie

Bei der fluoreszenzaktivierten Flußzytometrie (FACS = fluorescence activated cell sorting) kommen Immunfärbungen allein oder in Kombination mit anderen Methoden zur Anwendung. Die Immunzytometrie bietet den Vorteil, Antigene auf einzelnen Zellen nachzuweisen und dabei in kurzer Zeit einen großen Stichprobenumfang zu erfassen.

Die Detektion des Antigens erfolgt nach dessen Bindung durch einen monospezifischen Antikörper, der direkt mit einem fluoreszierenden Chromophor konjugiert ist oder durch einen solchen Sekundäntikörper markiert wird. In der Meßkapillare eines Durchflußzytometers (FACScan, FACScalibur, FACStar^{Plus}) werden die Zellen einzeln durch das Licht eines Anregungslasers und den Detektionsraum simultan geschalteter Photozellen geleitet. Dabei werden mittels entsprechender Optik drei (FACScan, FACStar^{Plus}) bzw. vier Fluoreszenzkanäle (FACScalibur), die seitliche Lichtstreuung als Maß der Granularität und die vorwärtsgerichtete Streuung mit einem Anteil gebeugten Lichtes als Maß der Zellgröße erfaßt.

2.4.1 Propidiumjodid

Eine in der Durchflußzytometrie gebräuchliche Methode zur Detektion toter Zellen beruht auf der Fähigkeit einer intakten Plasmamembran, das Eindringen geladener, fluoreszenter Moleküle in Zellen zu verhindern.

Einer der dafür am häufigsten verwendeten Farbstoffe ist Propidiumjodid, ein zweifach positiv geladenes Phenanthridiumderivat, das nur eine beschädigte Membran passieren kann (Macklis *et al.*, 1990). Im Zellinnern interkaliert es stöchiometrisch in doppelsträngige Nukleinsäuren (sowohl in DNA als auch in RNA), was zu einer Verstärkung der Fluoreszenz führt und eine Messung selbst in Gegenwart freien Farbstoffs erlaubt (LePecq *et al.*, 1967).

Die Färbung erfolgt durch Zugabe von 5 µg/ml Propidiumjodid zur jeweiligen Zellsuspension. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 5 Minuten: unmittelbar im Anschluß kann die Fluoreszenz auf dem FL3-Kanal gemessen werden.

Durch den Einsatz monoklonaler Antikörper, die je nach Bindungsspezifität mit einem verschiedenfarbigen Chromophor direktmarkiert sind, gelingt so der Nachweis von mehreren Antigenen auf einer Zelle. Da sich die Emissionsspektren der verfügbaren Chromophore zum Teil überlappen, muß die von zwei Photozellen doppelt detektierte Fluoreszenz vor der Messung durch Anpassung der Detektorempfindlichkeit subtrahiert werden (siehe unten).

Gezeigt sind die Emissionskurven von zwei Fluorochromen: Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE). Die FITC-Emission ist grün, zwischen 505 nm und 540 nm, die orange PE-Emission erstreckt sich zwischen 560 nm und 590 nm und ist bis über 600 nm ausgedehnt (Abbildung 4).

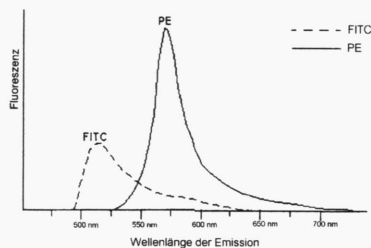


Abbildung 4

Emissionsspektren von Phycoerythrin (PE) und Fluoreszeinisothiocyanat (FITC).

In einem Zytometer sind geeignete Filter so platziert, daß nur ein enger Bereich der Fluorochromemission den jeweiligen Detektor erreicht. Diese Filter erlauben die Detek-

tion der jeweiligen maximalen Emission, wobei aber die Überlappung der Emissionen zu einer Detektion auch im benachbarten Kanal führt (Abbildung 5).

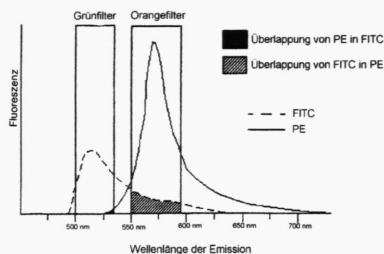


Abbildung 5

Überlappungsbereiche der Emissionsspektren von Phycoerythrin (PE) und Fluoreszeinisothiocyanat (FITC).

Da sich das FITC-Emissionsspektrum von 488 nm bis über 590 nm hinaus erstreckt und PE-Emissionen im Bereich zwischen 530 nm und 650 nm auftreten, kommt es zu größeren Überschneidungen, die in der Abbildung 5 schraffiert gezeichnet sind.

Beim Kompensieren wird das Fluoreszenzlicht, welches im Bereich des Photodetektors, der für einen Fluoreszenzbereich des benachbarten Fluorochroms detektiert, abgezogen.

2.4.2 Kompensation der spektralen Überlappung

Zur Kontrolle der Eigenfluoreszenz dient eine Zellprobe, die wie die anderen behandelt, aber nicht fluoreszenzmarkiert wird. Zusätzlich wird die unspezifische Färbbarkeit mit einem Kontrollantikörper überprüft, der mit dem gleichen Chromophor markiert ist wie die spezifischen Antikörper.

Die Empfindlichkeit der Photozellen eines Durchflußzytometers kann über ihre Meßspannung reguliert werden. Diese Einstellung wird zu Beginn einer Versuchsreihe vorgenommen um Signalwerte im Meßbereich zu erhalten. Sie wird im Laufe des Experiments nicht mehr verändert. Ist trotzdem eine Änderung dieser Einstellungen unumgänglich, kann das Gerät mit Beads definierter Größe und Fluoreszenzintensität kalibriert werden.

Zur Subfraktion der spektralen Überlappung zweier Chromophore (A und B) werden Zellen mit einem monoklonalen Antikörper markiert, der ein stark exprimiertes Epitop

bindet. Dazu verwendet man Konjugate der selben Spezifität mit je einem der Chromophore in separaten Färbungen mit dem selben Zelltyp aus einer Präparation. Parallel werden auch Kontrollantikörper mit den beiden Chromophoren in einem Ansatz inkubiert. Zur Messung werden nun gleiche Volumina der drei Färbungen (A, B, Kontrolle) in einem Röhrchen vereinigt. Für die Überprüfung der Kompensation wird ein Punktediagramm geöffnet, das die Fluoreszenzintensität A gegen B während der Messung darstellt. Innerhalb dieses Diagramms erleichtert eine Quadrantenstatistik die Zuordnung zu A^+ , B^+ und AB^+ . Doppelt positive Zellen sind in dieser Probe nicht vorhanden, da die spezifischen Antikörper getrennt voneinander mit den Zellen inkubiert worden sind und der Kontrollantikörper nicht bindet. Übersteigt der gemessene Anteil $A^+ B^+$ Zellen 1 %, muß im Menü „Kompensation“ reguliert werden. Dabei werden prozentuale Anteile der verschiedenen Fluoreszenzsignale voneinander subtrahiert, bis das Ergebnis der Messung dem Schema in Abbildung 6 (links) entspricht. Die Einstellung der Kompensation wird innerhalb einer Versuchsreihe nur geprüft und nicht verändert. Bei Dreifarbenanalysen muß die Kompensation für jedes Chromophorenpaar durchgeführt werden. Zur Messung der mehrfarbigen Proben werden die optimierten Einstellungen aufgerufen und die Signalwerte von 10^4 Zellen gespeichert.

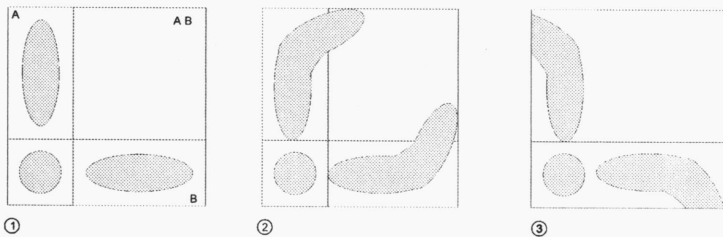


Abbildung 6

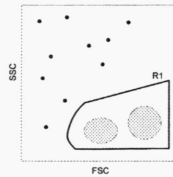
Kompensation der spektralen Überlappung zweier Chromophore. Durchflußzytometrische Messung von Negativkontrollen und separat gefärbten Positivkontrollen der Chromophore. 1 = korrekte Einstellung; 2 = spektrale Überlappung; 3 = Überkompensation.

Vorgehen bei der Kompensation und Bestimmung CD34⁺ Zellen

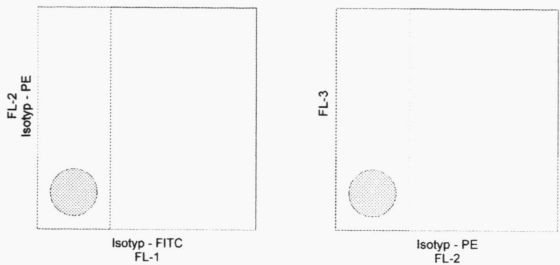
Benötigte Färbeansätze für mononukleäre Zellen:

- a) ungefärbte Zellen (zur Kontrolle der Autofluoreszenz)

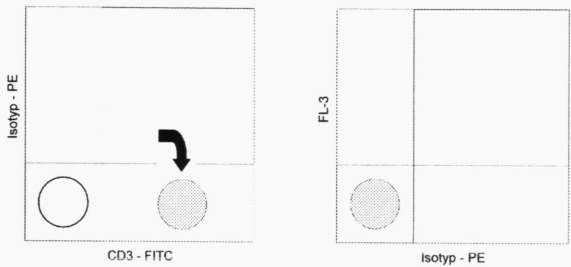
- b) Isotyp FITC und Isotyp PE
- c) Isotyp PE und CD3 FITC
(Färben mit einem beliebigen Antikörper der eine Population der MNC erkennt z.B. CD3, CD4, CD8)
- d) Isotyp FITC und CD3 PE
- e) Zusammenkippen von c und d
- f) CD45 FITC und CD34 PE
- l. Einstellen des FSC/SSC mit Probe b und setzen einer Region R1



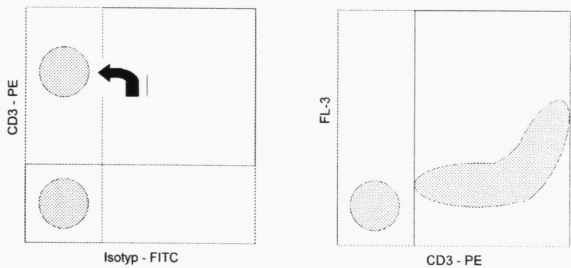
II. Erstellen von Dotplots (Punktediagrammauftragungen) der Fluoreszenz FL1 gegen FL2 (FL1/FL2) und FL2/FL3 mit G1 = R1 und justieren der Geräteeinstellungen für FL1, FL2 und FL3 mit Probe b.



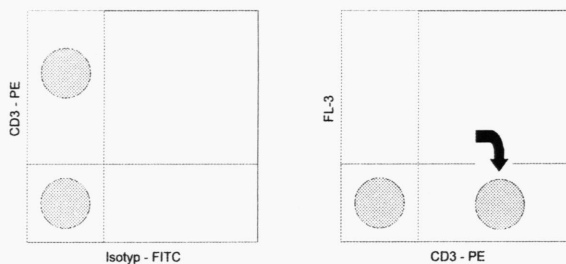
III. Kompensierung von FL2 - % FL1 mit Probe c



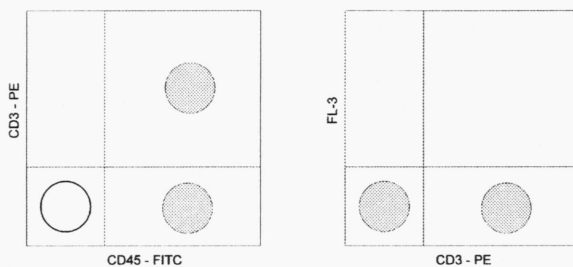
IV: Kompensierung von FL1 - % FL2 mit Probe d



V. Kompensierung von FL1 - % FL3 mit Probe d

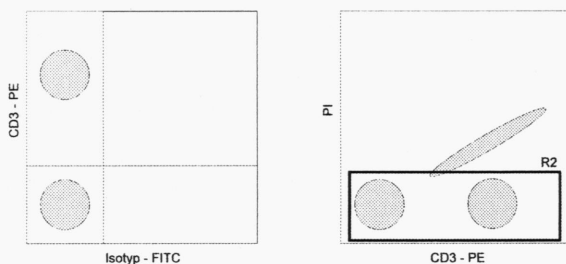


VI. Kontrolle der Einstellung mit Probe e



VII. Um die toten Zellen unterscheiden zu können wird Propidiumjodid zu allen Proben (siehe B 2.4.1.) zugesetzt

VIII. Einstellen der Region R2 für die lebenden Zellen mit Probe d



IX: Änderung der gate-Einstellung G1 = R1 auf G2 = (R1 und zugleich R2) im Dotplot FL1/FL2 um nur die lebenden Zellen zu messen. Tote Zellen binden unspezifisch und können das Ergebnis einer durchflußzytometrischen Messung verfälschen.

X: Die Proben a – f werden (mit Propidiumjodid) gemessen und unter Verwendung von einem Auswerteprogramm (WINMDI) ist der Gehalt an CD34⁺ Zellen bestimmbar. Bei der Analyse der CD34⁺-Zellpopulation wurde nach den ISHAGE-Richtlinien vorgegangen (Sutherland *et al.*, 1996).

Am FACScalibur ist es möglich mittels eines 2. Laser (633 nm) eine 4. Fluoreszenz FL4 zu detektieren. Wie oben beschrieben hat auch hier eine Kompensation gegen die anderen Fluoreszenzkanäle zu erfolgen.

2.4.3 Durchflußzytometrische Messung für Oberflächenantigene

Die Zellen wurden gewaschen und in PBS / 10 % AB (PAN Biotech, Aidenbach) resuspendiert um Fc-Rezeptoren zu blocken. Dann wurden die Zellen 30 min auf Eis mit dem monoklonalen Antikörper Max.3 inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS / 5 % AB-Serum wird ein sekundärer Ziege-anti-Maus FITC-konjugierter Antikörper (Becton-Dickinson, Hamburg) verwendet (30 min, 4 °C). Die Zellen wurden dann mit einem PE-konjugierten Maus-anti-human CD34-Antikörper (HPCA-2, Becton-Dickinson, Hamburg) und einem der folgenden PE-konjugierten monoklonalen Maus-anti-human Antikörper: Anti-CD38 (HIT2, Caltag), Anti-CD10 (ALB2), Anti-CD64 (22, beide Immunotech), Anti-CD41a (HIP8, PharMingen), Anti-CD19 (4G7, Becton-Dickinson), Anti-CD71 (Lo1.1., Becton-Dickinson), Anti-CD45 (2D1, Becton-Dickinson) oder Anti-CD32 (AT10, Serotec) gefärbt. Nach dem dreimaligen Waschen in PBS / 5 % AB wurden die Zellen in PBS / 2 % AB unter Zusatz von 5 µg/ml Propidiumjodid, um eine lebend-tot Zell-Unterscheidung zu ermöglichen, resuspendiert. Als Kontrollen wurden nur Zellen (kein Antikörper), ein Ansatz mit Isotypkontrollantikörper (passender Isotyp) und Positivkontrollen mitgeführt.

Bei direktkonjugierten Antikörpern erfolgte eine gleichzeitige Inkubation. Bei Vierfarbenanalysen wurde ein sekundärer Ziege-anti-Maus APC-konjugierter Antikörper verwendet.

Für die Expressionsanalyse wurde ein FACScalibur verwendet. Die markierten Zellen wurden sofort analysiert.

2.5 Laser Scanning Zytometrie

Das LSC (Laser Scanning Cytometer) ist ein mikroskopbasiertes Instrument, das Laser- und Epi-Fluoreszenz ermittelt um die relative Größe, interne Struktur und bis zu 4 Fluoreszenzen zu bestimmen. Diese Fähigkeiten verschaffen Informationen, die durch Durchflußzytometrie und Mikroskoptechniken auf Objektträgern gewonnen werden. Zusätzlich wird die Position und Zeit der Messung jeder einzelnen Zelle registriert. Zellen von Interesse können relokalisiert, visuell betrachtet, nachgefärbt, wieder vermessen und ihre Bilder gespeichert werden (WinCyt für Datenanalyse). Das LSC ermöglicht Elemente der Durchflußzytometrie und Bildverarbeitung objektträgerbasierter Proben (LSC Operators Manual, Cambridge, Massachusetts, USA).

Die Relokation von Zellen ist innerhalb $\pm 6 \mu\text{m}$ möglich. Zellen die eine feste Position auf einem Objektträger haben (die durch verschiedene Methoden auf den Objektträger zum Anhaften gebracht werden oder sich in einer viskosen Substanz [Glycerin] befinden), können zum Betrachten nach der Analyse relokalisiert werden.

Auf einem Polysinobjektträger (PolysineTM, Menzeler & Glaser) wird mit einem Prittstift (Henkel, Düsseldorf) 1 kleines Rechteck aufgezeichnet. In dieses Rechteck werden 50 μl FACS-Meßlösung (höchstens 5000 Zellen) pipettiert. Man läßt die Zellen 5 min sedimentieren. Es wird geprüft ob die passende Zellzahl aufgetragen wurde. Zwecks Verdunstung alle 7 min 20 μl aqua dest. dazugeben. Nach dem Vermessen der Fluoreszenzen werden die Objektträger 2 min, 1200 Upm (Cytofuge3, Shandon, Frankfurt a. M.) zentrifugiert und anschließend der Pappenheimfärbung (s. B 6.1.) unterzogen.

2.6 Zytochemische Methoden

2.6.1 Pappenheimfärbung

200 μl PBS mit der gewünschten Zellzahl (maximal 20000 Zellen) werden in eine Einmalcytospinapparatur Cytofunnel® vorgelegt und 10 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Die Zellen haften durch die Zentrifugalkraft in einem vormarkierten Kreis auf dem Objektträger an.

Nach dem Zentrifugieren löst man die Klammer des Cytooclips mit dem der auf dem Objektträger aufgesetzte Cytofunnel® gehalten wird, und verwirft den Einweg-Cytofunnel®.

Um eine morphologische Identifizierung zu ermöglichen werden die Objektträger mittels der Färbereihe May-Grünwald-Giemsa (siehe unten) gefärbt. Danach trocknen die Objektträger 10 min in schräger Stellung. Die Auswertung der Objektträger erfolgt unter dem Lichtmikroskop oder am LSC. Unterschieden werden Neutrophile (keulenförmige Zellen), Stabkernige (helle Zellen), Metamyelozyten (helle Zellen mit roten Granula), Promyelozyten (dunkelblaue Zellen mit roten Granula) und Blasten (dunkles Cytoplasma, runder Kern und ohne rote Granula) (Heckner, 1986).

May / Grünwald	5 min
Puffer pH 6,88	10 s
Giemsa (1 : 4 mit Pufferlösung pH 6,88 verdünnen)	20min
Puffer pH 6,88	10 s
Dest. H ₂ O	10 s

2.6.2 APAAP-Färbung von Zytospinpräparaten für den Eosinophilennachweis

Material: Zytospinpräparate der uniliniären Eosinophilenkulturen (siehe B 4.1.), die nach 12 h Lufttrocknung entweder bei -20 °C tiefgefroren wurden oder direkt gefärbt werden

Reagenzien:

Antikörper:

Monoklonaler Maus-anti-human	Becton Dickinson, Hamburg
Eosinophile Peroxidase-Antikörper (AHE-1)	
MOPC 21	Sigma, Deisenhofen
W6/32 polymorph gegen HLA-Klasse I	Sigma, Deisenhofen
Kaninchen-anti-Maus IgG (Brücken-Antikörper)	Dako, Hamburg
APAAP-Komplex	Dako, Hamburg
SIGMA FAST™ FAST RED ^{TR} /	Sigma, Deisenhofen
Naphthol AS-MX-Substrattabletten	
Tris/HCl-Tabletten	Sigma, Deisenhofen
Eindeckmedium Neo-Mount®	Merck, Darmstadt
Markierungsstift DAKO PEN	Dako, Hamburg
AB-Serum	PAN, Aidenbach
Aceton	Merck, Darmstadt
PBS	Biochrom, Berlin

Gebrauchslösungen:

Verdünnungslösung: PBS / 10 % AB

Brücken-Antikörper 1: 25
APAAP-Komplex 1 : 100
MOPC 21 1: 400
W6/32 1: 10
Maus-anti-human Eosinophile Peroxidase 2 µg/ml

Negativkontrolle:

1 Objektträger mit Kolonkarzinomzellen gefärbt mit MOPC 21 für den kein bekanntes Antigen existiert

Positivkontrolle:

1 Objektträger mit Kolonkarzinomzellen gefärbt mit Antikörper W6/32

Färbeprotokoll

1. Fixierung:

Fixieren der Präparate in reinem Aceton (10 min), anschließend 5 min in PBS tauchen, dann 5 min lufttrocknen.

2. Abblocken vorhandener Fc-Fragmente:

Zunächst werden die Zytospots auf den Objektträgern mit einem Markierungsstift umrandet um das Aufbringen der Antikörperlösung zu erleichtern und das Verlaufen der Lösungen außerhalb der Spotfläche zu vermeiden. Die Spots werden mit 300 µl PBS / 10 % AB 20 min überschichtet. Danach läßt man die AB-PBS-Lösung abtropfen und trocknet mit einem Filterpapier den Objektträger außerhalb der Umrandung. Da die Präparate nicht austrocknen dürfen, empfiehlt es sich die Objektträger nacheinander gesondert in Gruppen (3 - 4) zu behandeln, d. h. erst trocken wischen und unverzüglich mit der nächsten Lösung überschichten.

Die Objektträger werden mit Bleistift beschriftet. Für die folgenden Inkubationen werden die Objektträger in eine mit einem feuchten Tuch ausgekleidete Färbekammer gelegt.

3. Inkubation mit den Primärantikörpern

Die Präparate werden mit 100 µl Maus-anti-human Eosinophile Peroxidase (2 µg/ml) und die 2 Karzinomzellkontrollobjektträger mit 200 µl W6/32 bzw. MOPC 21 überschichtet. Nach 60 min läßt man die Objektträger abtropfen und gibt sie dreimal 5 min in ein PBS-Bad mit jeweils frischem PBS. Nach dem Abtropfen des PBS trocknet man die Objektträger außerhalb der Umrandung wieder.

4. Inkubation mit Brücken-Antikörper:

Die Spots werden mit je 200 µl Brücken-Antikörper 30 min überschichtet. Man gibt die Objektträger dreimal 5 min in ein PBS-Bad mit jeweils frischem PBS. Nach dem Abtropfen des PBS trocknet man die Objektträger außerhalb der Umrandung wieder.

5. Färbung mit FAST Red:

Die Spots werden jeweils mit 200 µl der Suspension der in bidest. Wasser aufgelösten FAST Red-Färbetabletten 40 min überschichtet.

FAST Red^{TR} / Naphthol AS-MX Substratlösung:

Eine Tris/HCl-Tablette wird in 1 ml bidest. H₂O aufgelöst. Eine FAST Red^{TR} / Naphthol AS-MX-Substrattablette wird zu der Lösung hinzugefügt und durch Schütteln komplett gelöst. Die Lösung ist unmittelbar vor dem Gebrauch herzustellen.

7. Häkalaun-Gegenfärbung:

Für die morphologische Analyse der Zellen empfiehlt sich eine Gegenfärbung mit Häkalaun. Um die Kerne zu färben werden die Objektträger (nicht die Kontrollen) 10 min in ein Häkalaunbad gegeben. Danach werden die Objektträger in einem Wasserbad mit VE-Wasser leicht gespült.

8. Eindeckeln:

Die Objektträger werden 2 h in Schrägstellung luftgetrocknet und mittels Aufbringen eines Tropfen Neo-Mount® auf die Objektträger wird jeweils ein 24 x 60 mm Glasdeckel zum Eindecken der Objektträger verwendet. Die Objektträger werden zur Lagerung bei -20 °C aufbewahrt

3 Isolierung und Aufreinigung primärer Blutzellen

Die Charakterisierung von definierten Zellpopulationen oder Einzelzellen erfordert häufig deren Isolierung aus einem heterogenen Zellverband bzw. Zellgemisch nach physikalischen, zellbiologischen oder immunologischen Merkmalen. Insbesondere hochsensitive molekularbiologische Analysen auf DNA-, RNA- bzw. Proteinebene, die unmittelbar an eine Zelltrennung oder nach Kultivierung isolierter Zellen angeschlossen werden können, setzen eine sehr effiziente Reinigung der gesuchten Zellfraktionen voraus.

Frühe hämatopoetische Vorläuferzellen tragen das Antigen CD34 und befinden sich in größerer Anzahl normalerweise im Knochenmark oder in der Nabelschnur. Bei Patienten der Hämatologie werden diese Zellen durch Chemotherapie und G-CSF-Gabe in das periphere Blut mobilisiert (0,5 - 6 % der MNC) durch Leukapherese angereichert (Pettengell *et al.*, 1993) und können zur Transplantation verwendet werden.

Für Experimente stehen nicht benötigte, eingefrorene Chargen (klinisches Backup) zur Verfügung. Sie werden bei 37 °C (Wasserbad) schnell aufgetaut, bis nur ein Rest Eis verbleibt, um Zellaggregation zu vermeiden.

3.1 Gegenstromelutriation

Für die Gewinnung von mononukleären Zellen wird gesunden Spendern (meist männliche Personen im Alter zwischen 20 und 40) per Leukapherese ein Leukozytenkonzentrat entnommen (Graw *et al.*, 1971) und mit einer Ficoll Dichtegradienten-Zentrifugation wieder angereichert (Johnson *et al.*, 1977). Zur Fraktionierung der Lymphozyten und Monozyten aus dieser Präparation dient die Gegenstrom-Zentrifugation (Elutriation) (Sanderson *et al.*, 1977).

Durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation über Ficoll-Paque (Pharmacia, Freiburg) wurden die mononukleären Zellen (MNC) von den restlichen Leukozyten in einem Blutzellseparator isoliert, in PBS aufgenommen und dreimal mit PBS gewaschen. Die 50 ml Elutriationskammer wird nach dem Zusammenbau und Anschluß an das System mit 6 % H₂O₂ gespült und 20 min sterilisiert. Das H₂O₂ wird mit PBS gründlich entfernt und das System mit Hanks / 6 % autologem Plasma luftblasenfrei gefüllt. Während die Zentrifugalkraft in diesem Verfahren konstant ist (2500 Upm = 600 g bei 4 °C), wird die Fraktionierung der Zellen durch die Variation der Gegenstromflußrate erreicht. Da verschiedene Einflußgrößen die Trennung beeinflussen können, wird kalibriert. Anschließend wird eine Eichgerade erstellt, anhand der man die Einstellungen bestimmt, bei denen die verschiedenen Fraktionen abgesammelt werden.

Fraktion	Volumen (ml)	Durchflußrate (ml/min)	Zellen
Ia	1000	52	Thrombozyten/Erythrozyten
Ib	1000	57	kleine Lymphozyten
Ila	1000	64	kleine Lymphozyten

IIb	500	74	kleine Lymphozyten
IIc	400	82	große Lymphozyten
IId	400	92	große Lymphozyten
III	800	111	Monozyten

Übersicht über die Einstellungsparameter und die in den Fraktionen abgesammelten Zellen.

Nach Abschluß der Separation wird die Apparatur mit isotonischer NaCl-Lösung gewaschen und mit Isopropanol konserviert.

Eingesetzt für CD34-Untersuchungen werden die gemäß ihrer Volumina gepoolten Elutriationsfraktionen „57 ml/min bis 111 ml/min“.

3.2 Zellseparation: FACS und MACS

Die fluoreszenz-aktivierte (FACS) und die magnetische (MACS) Sortierung stellen verbreitete Methoden zur Gewinnung reiner Zellpopulationen dar. Die Separation erfolgt im Falle der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung nach Streulicht- und/oder Fluoreszenzeigenschaften der Partikel, bei der magnetischen Sortierung nach Markierung von Oberflächenstrukturen der Zellen mit paramagnetischen Beads.

3.2.1 Die FACS-Sortiereinrichtung

Einige Durchflußzytometer, wie z.B. der hier verwendete FACStar^{plus} verfügen zusätzlich zur Lichtmessung über die Möglichkeit, Partikel nach definierten Kriterien zu sortieren. Dazu ist es notwendig, den aus der Düse austretenden Flüssigkeitsstrahl in kleine Tröpfchen zu zerlegen, von denen jeder höchstens eine Zelle enthalten sollte. Die Tröpfchen können durch einen kurzen Ladepuls aufgeladen und im elektrischen Feld zweier Kondensatorplatten abgelenkt werden. Voraussetzung dafür ist eine konstante Tropfenbildung, damit der Ladepuls tatsächlich den Tropfen erreicht. Dies wird erreicht, indem der Abriß des ausgetretenen Flüssigkeitsstrahls durch die Schwingung eines Piezokristalls induziert wird. Der Abriß des Strahls in einem Wellental erfolgt an definierter Stelle. Der Abstand zweier Tropfen entspricht der Wellenlänge der angelegten Schwingung. Darüber hinaus muß der Tropfen geladen werden, der die gewünschte Zelle enthält. Hierfür ist dem System die Zeit vorzugeben, die eine Zelle von der Anregung durch den Laser bis zum Abrißpunkt in Einheiten des Tropfenabstands braucht. Aus diesem Wert, dem durch die Schwingungsfrequenz bekannten Tropfenab-

stand und der intern aus dem Druck der Hüllflüssigkeit berechneten Geschwindigkeit bestimmt die Elektronik die Wartezeit bis zur Ladung des Tropfens. In dieser Zeit werden die von der Zelle erhaltenen Signale mit den vorgegebenen Sortbedingungen verglichen. Der Ladepuls wird angelegt, wenn die Signale mit den Bedingungen übereinstimmen. Da die Tröpfchen sowohl negativ als auch positiv geladen werden können, besteht die Möglichkeit, im konstanten Feld der Kondensatorplatten zwei verschiedene Populationen zu sortieren.

Die zu sortierenden Zellen werden wie unter B 2.4. beschrieben mit den entsprechenden fluorochrommarkierten Antikörper gefärbt. Auch am FACStar^{plus} ist eine Kompensation der spektralen Überlappung (siehe B 2.4.2.) nötig. Um die toten Zellen abzugrenzen wird kurz vor dem Sortiervorgang Propidiumjodid zur Zellsuspension zugesetzt. Handelt es sich bei dem Zellmaterial um zu Klumpung neigende Zellen so werden die Zellen vor dem Sortieren durch einen Separationsfilter filtriert.

Einzelzellsortierung

Werden Einzelzellen für PCR-Anwendungen sortiert, so werden 0,5 ml Safe-Lock-Eppendorfreaktionsgefäße mit

2,5 µl	PBS	Biochrom, Berlin
1,5 µl	RNase-freies H ₂ O	USB, USA
0,5 µl	DTT (100 mM)	Gibco BRL, Eggenstein
0,5 µl	RNase Inhibitor	Promega, Madison, USA

auf Eis aufbewahrt.

Mit Hilfe einer ACDU (Automated Cell Deposition Unit) wird eine Zelle entsprechend dem gewünschten Antigenprofil (z.B. CD34⁺ CD10⁺) in das Reaktionsgefäß sortiert. Mittels einer Tischzentrifuge unverzüglich herunterzentrifugiert (20 Sekunden, 1200 Upm) und das Reaktionsgefäß sofort auf Trockeneis gestellt.

Wird eine Zellpopulation bezüglich des Vorhandenseins bzw. Nichtvorhandenseins eines Antigens sortiert so ist unter geeigneter Verknüpfung verschiedener Regionen die sortierte Zielzelle gut abzugrenzen, d. h. bei einer Population die ein Kontinuum ohne distinkte Abgrenzung der markerpositiven von den markernegativen besitzt werden die 25 % positivsten bzw. 25 % negativsten Zellen ausgewählt.

Beim Sortieren von Zellpopulationen für Zellkulturanwendungen werden mit FCS-gepülte 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße auf der ACDU eingesetzt und die gewünschten Zellzahlen pro Gefäß in das entsprechende Medium sortiert.

Um bei seltenen Populationen eine gute Ausbeute in möglichst geringer Sortierzeit unter Vermeidung von Kontaminationen zu erhalten, wird eine CD34-Zellaufreinigung mittels MACS (siehe B 3.2.2) vorangestellt. Nach Beendigung des Sortiervorganges werden die Reaktionsgefäße mit den Einzelzellen bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

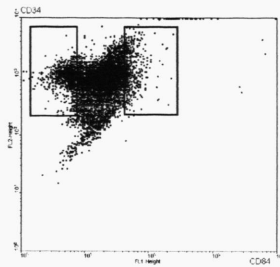


Abbildung 7

Gezeigt ist ein Punktediagramm mit der Abgrenzung der CD84⁺ von der CD84⁻ Teilpopulation beim Sortiervorgang.

3.2.2 Die MACS-Magnetische Zellsortierung

Das 1988 entwickelte Verfahren der magnetischen Zelltrennung (magnetic cell separation [MACS]) erlaubt eine Trennung von Zellen in Suspension nach ihren Oberflächenantigenen. Dazu werden die Zellen entweder direkt oder über den Zwischenschritt eines primären Antikörpers mit einem mit paramagnetischen Microbeads konjugierten Antikörper inkubiert. Diese paramagnetischen Beads, die aus Eisenoxid und Polysacchariden aufgebaut und damit biodegradierbar sind, haben einen mittleren Durchmesser von 50 nm und beeinträchtigen somit weitere optische Analysen, z.B. am Durchflußzytometer nicht (User Manual, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach).

Die Trennung erfolgt in einer mit ferromagnetischem Material gefüllten Säule, die in das Feld eines Permanentmagneten gebracht wird. Eine solche ferromagnetische Matrix verzerrt das homogene Magnetfeld und führt zu großen Gradienten, wodurch in ihrer unmittelbaren Umgebung bis zu 10000-fache magnetische Kräfte entstehen. Diese starken Kräfte bewirken ein Festhalten der markierten Zellen in der Matrix der Trenn-

säule, wohingegen die nicht markierten unbeeinflusst die Säule passieren. Nach der Entnahme der Trennsäule aus dem Magnetfeld kann der Anteil der positiven Zellen einfach mit PBS ausgewaschen werden.

Zur Separation bieten sich, je nach Versuchsansatz, zwei unterschiedliche Vorgehensweisen an. Zum einen ist dies die Positivtrennung, bei der das Hauptaugenmerk auf eine möglichst hohe Reinheit der positiven Fraktion gelegt wird, zum anderen die Depletion, bei der umgekehrt die negative Population möglichst rein sein sollte. Beide Ansätze verwenden verschiedene Trennsäulen. Im ersten Fall besteht die Matrix aus ferromagnetischen Kügelchen, deren Abstände voneinander regelmäßig und so groß sind, daß sehr schwach markierte Zellen nicht festgehalten werden. Im zweiten Fall besteht die Matrix aus einem unregelmäßigen Geflecht, in dem immer wieder sehr kleine Abstände mit sehr hohen Feldgradienten auftreten, so daß auch schwach markierte Zellen in der Säule gehalten werden. Hier läßt sich die Sortierung durch Steuerung der Durchlaufgeschwindigkeit mit unterschiedlichen Kanülengrößen beeinflussen. Eine geringere Geschwindigkeit führt dabei zur Erhöhung des Anteils zurückgehaltener Zellen.

Bei den hier durchgeführten Versuchen kamen Positivsäulen zum Einsatz, da die magnetische Trennung mit Depletionssäulen nicht ausreichend war.

3.2.2.1 *Aufreinigungsverfahren hämatopoetischer Vorläuferzellen*

Materialien (alle Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach):

Zellseparator VarioMACS

Magnetseparationssäulen

MS⁺ Zellzahl unter 2×10^8

LS⁺ Zellzahl unter 2×10^9

Microbeads

(= colloidale paramagnetische Microbeads gekoppelt an einen monoklonalen Maus-anti-human Antikörper) CD34 (Qbend 10), CD2, CD19, CD14, CD15, CD33, CD45RA, CD56, CD61

Multi Sort Stop Reagens

(zur Verhinderung der enzymatischen Abspaltung bei weiteren Reaktionen)

Multi Sort Release Reagens

(für die enzymatische Abspaltung der an die Zelloberfläche gebundenen Sortbeads)

FcR Blocking Reagens

Säulenseparationsfilter

Waschpuffer: PBS / 2% FCS / 2mM EDTA

Wenn die Zellen zum klumpen neigen 100 U/ml DNase I (Roche, Mannheim) zusetzen. Den Waschpuffer mit einer Perfusorspritze entgasen, d. h. blasenfrei aufziehen und in ein steriles Gefäß langsam an der Gefäßwand entlang laufen lassen.

Vorgehen:

Die Isolierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen wird durch Positivselektion CD-exprimierender Zellen erreicht. Mononukleäre Zellen von peripherem Blut, Nabelschnurblut, Knochenmark oder Aphereseprodukten, die über Dichtegradienten-Zentrifugation oder Ficoll Paque erhalten wurden, werden als Ausgangsmaterial verwendet. Bei der MACS-Separation werden direktmagnetisch gekoppelte CD34-Antikörper verwendet. Die magnetisch konjugierten Zellen werden auf Positivselektionssäulen im Magnetfeld eines VarioMACS-Zellseparators angereichert. Die Elutriationsfraktionen Ib₂ – IIId (siehe B 3.1) werden in äquivalenten Volumenverhältnis abzentrifugiert (1200 Upm, 7 min), mit Waschpuffer gewaschen und in diesem Waschpuffer aufgenommen (10⁸ Zellen in 300 µl Waschpuffer). Je 300 µl Zellsuspension wird 100 µl FcR Blocking Reagens zugesetzt und nach kurzem Mischen (Vortex), 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Pro 400 µl Suspensionsvolumen werden 100 µl Multi-Sort-CD34-Magnetbeads zugegeben und nach kurzem Mischen (Vortex), 30 min bei 4 °C inkubiert. Eine MACS-Positivselektionssäule plus Säulenadaptor wird in das Magnetfeld eines Separators gebracht. Die Säule (entsprechend der Zellzahl) wird zweimal mit 0,5 ml (MS⁺) bzw. 1 ml (LS⁺) Waschpuffer gewaschen. Wobei der Puffer bis zum letzten Tropfen eluiert werden muß. Um Aggregate aus der Zellsuspension zu entfernen, wird ein Säulenseparationsfilter auf die Säule aufgesetzt. Säule und Filter werden durch Spülen mit 0,5 ml Waschpuffer vorbereitet. Die Bead-Zell-Suspension wird nach kurzem Mischen über einen Säulenseparationsfilter auf die Säule gegeben.

Nach dreimaligem Waschen mit der eingangs verwendeten Waschpuffermenge wird 0,5 ml Waschpuffer mittels eines Stempels so durch die aus dem Magnethalter (VarioMACS) entfernte MS⁺-Säule gedrückt, daß die magnetgekoppelten Zellen auf eine zweite sich nun im VarioMACS befindende „gewaschene“ MS⁺-Säule gelangen.

Nach zweimaligem Waschen mit 0,5 ml Waschpuffer wird die Positivzellsuspension mit einem Stempel durch die aus der Magnetapparatur entfernte MS⁺-Säule in ein steriles

Polystyrolröhrchen gedrückt. Nach Durchführung der Zellzählung werden die Positivzellpopulationen für eine durchflußzytometrische Bestimmung des CD34-Gehaltes mit fluorochrommarkierten Antikörpern gefärbt (siehe B 2.4). Für die Kompensationsfärbungen werden Zellen aus den zu verwerfenden Negativfraktionen verwendet. Die Ausgangssuspension, Negativlösungen, Waschsuspensionen werden für eine Bestimmung der Aufreinigungseffizienz aufbewahrt (Kögler *et al.*, 1998; de Wynter *et al.*, 1998).

3.2.2.2 *Linien spezifische Depletion mittels MACS*

Es ist möglich CD34⁺-Zellpopulationen bezüglich verschiedener anderer Oberflächenmarker zu isolieren. Die aufgereinigten Zellen werden mit Multi Sort Release Reagens versetzt um die magnetischen Beads von den Zellen der ersten Positivfraktion zu entfernen. Der Primärantikörper verbleibt an den Zellen. Mit magnetischen Beads, die gegen ein Fluorochrom oder direkt an einen Antikörper gekoppelt sind, ist eine weitere Magnetseparation und Separierung von Zellen für einen anderen interessierenden Oberflächenmarker möglich.

Pro Milliliter paramagnetisch konjugierte Zellen (siehe oben) werden 20 µl des Release Reagens zugesetzt und im Kühlschrank 10 min bei 4 °C inkubiert. Diese Zellsuspension wird über eine vorbereitete Säule (MS⁺ oder LS⁺) gegeben um die Magnetkügelchen und verbleibende magnetisch markierte Zellen abzutrennen. Die eluierten Zellen werden mit Waschpuffer gewaschen (1200 Upm, 7min) und das Zellpellet in einem Volumen von 50 µl pro 10⁷ Zellen aufgenommen. Für je 10⁷ Zellen werden 30 µl des Multi Sort Stop Reagens zugesetzt und kurz gemischt (Vortex). Für je 10⁷ Zellen werden je 20 µl der direktkonjugierten MACS-Microbeads (CD61, CD33, CD45RA, CD56, CD15, CD14, CD19 und CD2) zugesetzt und 30 min im Kühlschrank (4 °C) inkubiert. Diese Zellsuspension wird auf eine vorbereitete MS⁺-Säule gegeben und zweimal mit 0,5 ml Waschpuffer gespült. Die eluierte Negativzellsuspension beinhaltet die CD34⁺ Lin⁻ Zellen. Diese Zellen werden dann in den uniliniären Differenzierungskulturen (siehe B 4.) eingesetzt.

4 Flüssigkultur-Assays

4.1 Langzeitflüssigkulturen

Für flüssige Langzeitkulturen wurden 1000 Zellen direkt in eine 24-Lochplatte (Falcon, Heidelberg) unter Verwendung der automatisierten Zellablageeinheit (ACDU) am FAC-Star^{Plus} gesortet. Jedes Loch enthielt 0,5 ml IMDM (Gibco BRL, Eggenstein) mit 25 % FCS und den rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren: G-CSF (500 U/ml), SCF (100 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), IL-6 (100 U/ml). Nach jeweils 7 Tagen Kultur bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ werden pro Loch nochmals 500 µl Medium mit Wachstumsfaktoren zugegeben. Nach 14, 21 und 28 Tagen werden die Zellen entnommen mit IMDM / 25 % FCS gewaschen (1200 Upm, 7 min), das Zellpellet in 150 µl IMDM / 25 % FCS resuspendiert und ein Fünftel wurde in frischem Medium mit Wachstumsfaktoren im gleichen Loch weiterkultiviert. Die verbleibenden Zellen wurden auf ihre Koloniebildungsfähigkeit untersucht. Bei der wöchentlichen Ermittlung der Gesamtzahl kernhaltiger Zellen und Vorläuferzellen wurde ein Korrekturfaktor verwendet um die entfernten Zellen zu kompensieren.

Morphologische und durchflußzytometrische Untersuchungen wurden vorgenommen. Mittels dieses flüssigen Langzeitkultur-Assays ist es auch möglich, die Koloniebildungsfähigkeit von sehr primitiven Vorläuferzellen in einem einfachen flüssigen Kultur-Assay zu detektieren. Es ermöglicht die Ermittlung der Proliferationskapazität der Zellen an den jeweiligen Entnahmezeitpunkten (14, 21 und 28 Tage). Alle Kulturen wurden in Triplikaten angesetzt.

4.1.1 Uniliniäre Differenzierungskulturen

Um die uniliniäre Differenzierung von CD34⁺ Lin⁻ Zellen (s. B 3.2.1) zu untersuchen werden diese Zellen wie eben beschrieben in CellGro + 40 µg/ml LDL (Sigma, Deisenhofen) unter Zusatz von SCF (10 ng/ml) für eine Mastzell-Differenzierung, TPO (100 ng/ml) für die megakaryozytäre Linie und unter Zugabe von IL-5 (500 U/ml), GM-CSF (0,1 ng/ml) und IL-3 (1 U/ml) zur Generierung von Eosinophilen kultiviert. Granulozytäre Differenzierung wurde durch Zugabe von IL-3 (1 U/ml), GM-CSF (0,1 ng/ml) und G-CSF (500 U/ml) erzielt (Ziegler *et al.*, 1998).

Neutralisierende Antikörper, zusätzliche Zytokine und Kontrollzusätze werden jeweils in Triplikaten angesetzt.

MIP-1 α (500 ng/ml), TGF- β (20 ng/ml) und IFN- γ (2000 U/ml) werden zugefügt um den Einfluß von Zytokinen auf die uniliniäre Differenzierung zu ermitteln. Anti-MIP-1 α (100 ng/ml), Anti-TGF- β (2 μ g/ml) und Anti-IFN- γ (10 μ g/ml) fungieren jeweils als neutralisierende Agentien. In den Kontrollen werden Zytokin und entsprechender neutralisierender Antikörper eingesetzt.

4.1.2 CD84-Einfluß in Langzeitkulturen

Wie in B 4.1 beschrieben werden CD34⁺ gesortete Zellen jeweils unter Zugabe von CD84-Antikörperlösung (50 μ l), CD15-Antikörper (20 μ l) und Kontroll-IgG gesamt (20 μ l) in Triplikaten kultiviert und deren Einfluß auf die *in vitro* Kultur ermittelt (Zellzahl und Morphologie).

4.2 Kurzzeitflüssigkultur

Die Elutriationsfraktionen 57 ml/min bis 111 ml/min werden abzentrifugiert (1200 Upm, 7 min) und in PBS / 10 % AB aufgenommen. Die Zellen werden mit PE-konjugierten CD34-HPCA-2-Antikörper gefärbt und mit Anti-PE-Microbeads gekoppelt (siehe B 3.2.2).

Sodann werden die eluierten CD34⁺ Zellen mit CD84 FITC gefärbt.

CD84⁻ CD34⁺ Zellen wurden mittels durchflußzytometrischer Sortierung isoliert (siehe B 3.2.1). 25 x 10³ CD84⁻ Zellen wurden in serumfreiem Medium (CellGro) mit IL-3 (20 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml), G-CSF (20 ng/ml), FL (100 ng/ml), und SCF (100 ng/ml) kultiviert. Die in Zellkulturschalen (10 x 35 mm) eingesetzten Zellen werden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert.

Nach 24, 48 und 72 h wurden die Zellen mit PE-konjugierten monoklonalen Maus-anti-human CD34-Antikörper (581, Immunotech) und CD84 FITC gefärbt. Propidiumjodid-negative Zellen wurden am FACScalibur analysiert um die Antigenexpression von Vorläuferzellen in Kurzzeitkultur zu ermitteln.

5 Colony-Assays

Große Fortschritte wurden innerhalb der letzten Jahrzehnte bei der Untersuchung der hierarchischen Beziehungen von Vorläuferzellen erzielt. Vielfach können diese jetzt durch *in vitro* Colony-Assays detektiert werden. Die ersten Colony-Assays für humane hämatopoetische Vorläuferzellen wurden 1967 durch eine kanadische Arbeitsgruppe beschrieben. Dies war die Fortsetzung von Mausexperimenten, die das Konzept der Ermittlung primitiver hämatopoetischer Zellen retrospektiv durch Stimulation deren Entwicklungspotentials erstmals einführten. Kulturbedingungen, die die *in vitro* Bildung von erythroiden Zellen, Granulozyten, Makrophagen und Megakaryozyten als auch von deren Kombinationen ausgehend von menschlichen hämatopoetischen Zellen beschreiben, sind jetzt bekannt. Diese Koloniebildungs-Assays dienen als *in vitro* Assay zur funktionellen Untersuchung von Progenitorzellen. Die Detektion der klonalen Bildungsfähigkeit von einzelnen Vorläuferzellen, die in einer Ausgangszellsuspension vorhanden sind, wird durch das Ausplattieren von Zellen in einem gelierenden Medium, das die Zellbewegungsmöglichkeiten vermindert, erreicht. Je reifer die Zellen dieser Ausgangszellsuspension sind um so schneller werden diese in der Kultur lysiert. Neue Zellen, die als lokal wachsende Kolonien sichtbar sind, können daher leicht mittels eines Invertmikroskops identifiziert werden. Das Vorhandensein von reproduzierbaren und quantitativen *in vitro* Assays für eine Vielzahl von verschiedenen hämatopoetischen Vorläuferzellen ist eine gute Möglichkeit sowohl die normale als auch abnormale Hämatopoese zu untersuchen. Diese Methoden sind geeignet um den Vorläuferzellgehalt von Knochenmarks- oder Blutzellpopulationen vor und nach verschiedensten *in vitro* Bearbeitungen, beispielsweise bei allogenen oder autologen Transplantationsverarbeitungstechniken, zu ermitteln. Um die Variabilität sowohl im Koloniewachstum und Erscheinungsbild zu vermeiden werden standardisierte Kulturbedingungen bezüglich Temperatur, O₂ - und CO₂ - Gehalt und Luftfeuchtigkeit angewandt. Bei Proben, die durch krankhafte Prozesse z.B. Akute Leukämien veränderte Vorläuferzellen enthalten, entstehen stark veränderte Koloniemorphologien. Zusätzlichen Einfluß haben die Zellverarbeitungsmethode, die Reinheit der Ausgangszellen, die Konzentrationen und Arten der im Assay verwendeten Wachstumsfaktoren. Aber auch die Inkubationszeiten vor der Koloniezählung und Morphologieermittlung sind wichtig.

Kolonietypen in Kultur von normalen humanen Blut- und Knochenmarkszellen

Alle hämatopoetischen Kolonien entstehen aus sich teilenden und differenzierenden Einzelzellen, die die Koloniebildung anstoßen und dann morphologisch erkannt werden können. Unter den in den Colony-Assays benutzten Bedingungen scheinen die meisten Vorläuferzellen weiter zu differenzieren, bis sie nach einer bestimmten Inkubationszeit den Reifezustand erreicht haben und die Kolonie nicht mehr weiterwächst. Zu diesem Zeitpunkt müssen die Kolonien ausgewertet werden, da dann die reifen Zellen zu lysieren beginnen. Die Kolonienentwicklung erlaubt es unterschiedliche Stufen der Vorläuferzellentwicklung zu unterscheiden. Je größer die Kolonie und je größer die Zahl der Zellen in der Kolonie um so größer war die proliferative Kapazität und um so primitiver war die ursprüngliche Ausgangszelle aus der sie hervorging.

Methylzellulose-Assay

Kulturansatz:

Nach dem Auftauen (2 h bei Raumtemperatur) des Methylzellulosemediums Methocult™ H4434 (StemCell Technologies, St. Katharinen) wird mit einer 10 ml Pipette 4 ml des Mediums in 10 ml Polystyrolröhrchen abgefüllt und die in 100 µl RPMI 1640 aufgenommene vierfache Zellzahl, die für eine Kulturschale vorgesehen ist, zugesetzt. Die hierfür notwendigen Verdünnungsreihen erfolgen in IMDM. Nach 20 s Mischen (Vortex) und 3 min Stehenlassen bei Raumtemperatur wird mittels einer 1 ml-Spritze mit einer 0,2 mm Kanüle jeweils 1 ml hochviskoses Medium daraus entnommen und unter Vermeidung von Luftblasenbildung in eine 10 x 15 mm Petrischale langsam überführt. Pro Zellzahl sind 3 Schälchen zu erstellen. Die im Medium beim Ausgießen entstandenen Luftblasen sind mit einer sterilen Pipettenspitze zu zerstören.

Jeweils 2 Methylzellulosemedium-haltige Schälchen werden mit 1 Schälchen mit 1,5 ml PBS in eine Petrischale (100 x 15 mm) gestellt und 14 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Sodann werden die Colony-Assays mittels eines Invertmikroskops meanderförmig nach dem Vorhandensein von Kolonien (siehe unten) ausgewertet. Die verschiedenen Zellkolonien werden unter dem Binokular ausgezählt und der Anteil an CFC pro eingesetzter Zellzahl bestimmt.

MethoCult™-Zusammensetzung:

0,9 %	Methylzellulose
30 %	FCS
1 %	BSA
10 ⁻⁴ mM	2-Mercaptoethanol
2 mM	L-Glutamin
10 %	Agar Leucocyte conditioned Medium
3 U/ml	r hu EPO

Beim Kolonienwachstum in Methylzellulosemedien mit Wachstumsfaktoren erfolgt die Auswertung aller Koloniearten nach 14 Tagen Inkubation. Bereits nach 16 Tagen werden hierbei die granulopoetischen Kolonien so groß, daß die Identifizierung von CFU-E abgeleiteten Kolonien nicht mehr möglich ist. Jedoch sollte die Auswertung nicht vor dem 14. Inkubationstag erfolgen, da die erythroiden Kolonien dann noch nicht hämoglobiniert sind und somit irrtümlich als granulopoetisch gezählt würden. Man sollte auch bei allen Arbeiten bedenken, daß die Methylzellulose kein festes Medium sondern eine viskose Flüssigkeit ist, deren Koloniebildung durch Schütteln der Kulturschalen beeinträchtigt wird. Die durchschnittliche Zahl von Kolonien im Methylzellulosemedium einer Petrischale wird ermittelt um die durchschnittliche Zellzahl der einzelnen Vorläuferzelltypen in der Ausgangszellsuspension zu bestimmen. Diese wird auf die Zahl in einer Petrischale ausplattierter Ausgangszellen bezogen.

5.1 Erythroide Kolonien

In Methylzellulose-Assays generieren erythropoetische Vorläuferzellen die Kolonien so, daß sie im Reifezustand aus einer variierenden Zahl von Clustern hämoglobinisierter Erythroblasten bestehen. Normalerweise entstehen diese nicht ohne eine ausreichende Menge Erythropoietin (EPO) im Medium. Jedoch werden die frühen Stufen der erythroiden Vorläuferzellproliferation durch andere Faktoren stimuliert und daher entstehen auch in Abwesenheit von EPO eine Reihe von Kolonien ausgehend von einzelnen BFU-E deren Weiterwachstum stagniert. Die Gesamtzahl der Cluster von hämoglobinierten Erythroblasten, die eine erythroide Kolonie bildet, fungiert als Maßstab die Koloniegröße und die Differenzierungsstufe der erythroiden Ausgangsvorläuferzelle zu bestimmen. Das Ausmaß zu dem einzelne Cluster als abgegrenzte Einheiten erscheinen ist auch von den Kulturbedingungen abhängig. Eine davon ist die Methylzellulosekonzentration des Mediums. Je viskoser das Medium um so größer ist das Bestreben der Cluster von Erythroblasten in einer großen Zellgruppe zu bleiben, wohingegen bei geringer

Viskosität eine größere Tendenz zum Zerteilen in eine größere Anzahl kleinerer Cluster besteht. Die Typen und Konzentrationen von Wachstumsfaktoren sind ein weiterer Parameter, der die erythroide Koloniemorphologie beeinflusst.

CFU-E

CFU-E (Abbildung 8) ist die Bezeichnung für die Vorläuferzellen, welche die kleinsten und am schnellsten reifenden erythroiden Kolonien hervorrufen. Reife durch CFU-E verursachte Kolonien bestehen aus 1 bis 2 Cluster von maximal 200 Erythroblasten. Jeder Cluster besitzt mindestens 8 Erythroblasten. Die Erythroblasten sind aufgrund ihres Hämoglobingehalts eindeutig durch einen rötlich-orangen Farbton erkennbar. Nach 12 Tagen Kultur erreichen die von CFU-E abgeleiteten Kolonien ihren Reifezustand, danach beginnt die Lyse der Kolonien. Bei der Kolonienauswertung nach 14 Tagen erscheinen wegen der beginnenden Lyse schon bräunliche Erythroblasten.

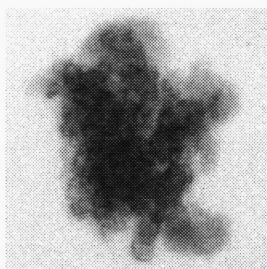


Abbildung 8

BFU-E

Der Begriff BFU-E (Abbildung 9) wird verwendet um eine Klasse von primitiveren Vorläuferzellen als den CFU-E zu beschreiben. Das unterscheidende Kriterium ist die größere proliferative Kapazität, die größere und vielgeclusterte erythroide Kolonien entstehen läßt. Die Bezeichnung „burst“ wurde geprägt um das plötzliche Auftreten von Hämoglobin in bereits bestehenden vorher farblosen erythroiden Kolonien bei einem halbsynchronen erythroiden Differenzierungsprozeß zu charakterisieren. BFU-E's haben eine traubenförmige Morphologie, besitzen mindestens drei kleine Cluster mit mehr als 200 Erythroblasten bis hin zu reinen Erythroblastenkolonien mit 16 oder mehr Clustern und 10^4 Einzelzellen. Oftmals wird noch zwischen reifen und primitiven BFU-E subklassifiziert. Reife BFU-E identifizieren direkte Vorläufer der CFU-E. Sie sind durch die

Fähigkeit charakterisiert erythroide Kolonien mit 3 – 8 Erythroblastencluster - was reifen Kolonien mit 100 – 500 Zellen entspricht - hervorzubringen. Kolonien von reifen BFU-E sind normalerweise nach 12 Tagen hämoglobiniert und erscheinen nach 14 Tagen bräunlich. Primitive BFU-E sind als diejenigen Vorläuferzellen definiert die 9 oder mehr Cluster von hämoglobinierten Erythroblasten (mindestens 500 Zellen) hervorrufen. Diese Kolonien sind oftmals am Tag 14 noch nicht voll hämoglobiniert.

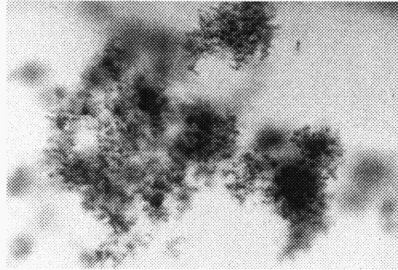


Abbildung 9

5.2 Granulopoetische Kolonien

Klonogene Vorläuferzellen von Granulozyten (CFU-G), Makrophagen (CFU-M) oder beiden (CFU-GM) werden nach ihrer Fähigkeit Kolonien mit einem Minimum von 20 dieser Zellen hervorzurufen definiert. Granulopoetische Vorläuferzellen waren die ersten klonogenen hämatopoetischen Zellen, die in semisoliden Medien zum Wachsen gebracht wurden. Daher wurden sie zunächst CFU-C (colony-forming unit-culture) genannt. Als später bekannt wurde, daß es sich bei den CFU-C um Populationen von Vorläuferzellen handelt, deren größerer Teil auf die Granulozyten- und/oder Makrophagen-differenzierung beschränkt ist, wurden die Bezeichnungen CFU-G, CFU-M und CFU-GM eingeführt. Zunächst waren die granulozytären Kolonien, die *in vitro* erhalten wurden, Kolonien von Neutrophilen und/oder Makrophagen. Erst später wurden Kolonien von Eosinophilen und Basophilen (oder Mastzellen) erkannt. Eosinophile und Basophile sind typischerweise nicht mit Makrophagen vermischt und haben auch in ungefärbten Preparationen ein anderes Erscheinungsbild: Neutrophile sind kleine Zellen, Makrophagen sind größer bis sehr groß; Kolonien von Basophilen werden im Routinemethylzellulose-Assay selten gefunden. Häufiger sind Eosinophile insbesondere in Assays von

peripheren Blutzellen. Kolonien von Granulozyten und Makrophagen (Abbildung 10) werden entsprechend ihrer unterschiedlichen Größe klassifiziert.

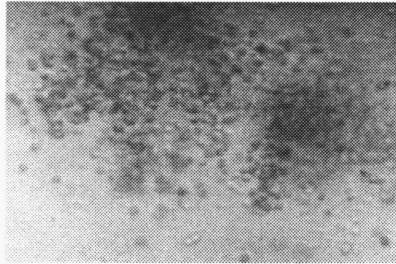


Abbildung 10

5.3 Multi-lineage Kolonien

CFU-GEMM (Abbildung 11) ist der Name, der den Vorläuferzellen gegeben wurde, die Kolonien erzeugen, welche viele Linien von unterschiedlichen Zelltypen einschließlich erythroider Zellen hervorrufen. Meist sind Granulozyten, Makrophagen und/oder Megakaryozyten in der Peripherie der hämoglobinierten erythroiden Zellen.

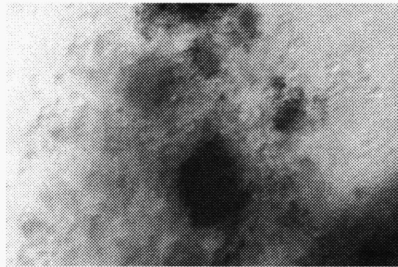


Abbildung 11

5.4 Megakaryozytäre Kolonien

Megakaryozytenvorläuferzellen können auch in Methylzellulose detektiert werden. Jedoch sind sie besonders sensitiv für die Inhibierung durch enthaltenes TGF- β , welches die optimale Megakaryozytenbildung verhindert. Viel wichtiger, obwohl viele Megakaryozyten ein großes und durchsichtiges Erscheinungsbild haben, ist die genaue Abtrennung von Makrophagen. Um Megakaryozytenvorläufer (CFU-Mk) nachzuweisen ist ein serumfreies Nachweissystem mit geeigneten Wachstumsfaktorkombinationen emp-

fehlenswert. Diese Kulturen können fixiert und mittels eines megakaryozytenspezifischen Antikörpers detektiert werden.

5.4.1 Megakaryozyten-Assay

Zellen der megakaryozytären (Mk-) Reihe sind besonders empfindlich gegenüber dem Wachstumsfaktor TGF- β , der gewöhnlich in FCS enthalten ist, das für Ansätze der anderen hämatopoetischen Zelllinien verwendet wird. Kombinationen von Wachstumsfaktoren, mit denen man die Anzahl von erythrozytären und granulozytären bzw. monozytären Vorläuferzellen im selben Ansatz feststellen kann, fördern kein optimales Wachstum von CFU-Mk. Diese Einschränkungen sind überwunden worden durch den Einsatz von Medien, die definierte Serum-Ersatzstoffe und Kombinationen von Zytokinen, mit Mk-stimulierender Wirkung wie Thrombopoietin, IL-3, IL-6, IL-11 und Stammzellfaktor enthalten (Bruno *et al.*, 1988; Hogge *et al.*, 1997).

Da bereits 3 Zellen eine ursprünglich vorliegende megakaryozytäre Vorläuferzelle anzeigen, ist die CFU-Mk-Ermittlung schwierig. Zusätzlich sind Megakaryozyten schwer von anderen Zelllinien - besonders den Makrophagen - zu unterscheiden.

Der Einsatz von Collagengel ist erwiesenermaßen geeignet für die Kultivierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen und hat deutliche Vorteile verglichen mit anderen halbfesten Medien. Neutralisiert bilden isotonische Collagene bei einer Endkonzentration von 1 - 2 % bei 37 °C geeignete, stabile Gele. Sie können für eine nachfolgende histochemische oder immunzytochemische Färbung leicht entwässert werden. Alternativ dazu können lebensfähige Zellen durch Verdau der Collagen-Matrize mit Collagenase für weitere Untersuchungen gewonnen werden. Die CFU-Mk werden dargestellt durch Färbung der Zellen mit einem primären gegen das Mk-spezifische Antigen gp11b / IIIa gerichteten monoklonalen Antikörper, der an ein System aus sekundärem biotiniliertem Antikörper und alkalische Phosphatase Avidin gekoppelt ist um die primäre Bindung zu verstärken.

Kulturansatz

Das Megakaryozytenmedium 2 h bei Raumtemperatur auftauen und Collagen auf Eis zugeben.

Endkonzentration von Mediumkomponenten nach Zugabe von Zellen und Collagen:

1,1 mg/ml	Collagen
1 %	Rinder-Serum Albumin
0,01 mg/ml	Rinder Pankreas Insulin
0,2 mg/ml	humanes Transferrin
10 ng/ml	r hu IL-6
10 ng/ml	r hu IL-3
50 ng/ml	r hu Thrombopoietin
in Iscove's MDM	

Vorgehen:

Zu 2 ml Medium mit Wachstumsfaktoren gibt man 0,1 ml Zellsuspension, die vorher mit IMDM hergestellt wurde, in einer 33-fachen der gewünschten Endkonzentration. Man vortext das Röhrchen mit der Medium-Zellsuspension. Mit einer sterilen 2 ml-Pipette überführt man 1,2 ml kaltes Collagen in das Röhrchen und vortext wieder. Mit derselben 2 ml Pipette entnimmt man 1,5 ml der endgültigen Mischung und gibt 0,75 ml in jede der zwei Vertiefungen, der vorher beschrifteten Kammer-Träger. Man verteilt die restlichen 1,5 ml in einen zweiten Kammer-Träger. Man entfernt die Luftblasen, indem man die Luftblasen sanft mit dem Ende einer Pipette antippt. Nach Zugabe des Collagen fängt das Zell-Medium innerhalb von Minuten zum Gelieren an. Wenn mehr als ein Röhrchen angesetzt wird, sollte das Collagen nur ins erste Röhrchen gegeben werden und der Inhalt in die Kammer-Träger verteilt werden, bevor man zum nächsten Röhrchen weitergeht. Vorsichtig jeden Kammer-Träger mit einer zirkulierenden Bewegung zur gleichmäßigen Mischung in der Kammer anregen. Jeder Kammer-Träger wird in eine 100 mm-Petrischale mit einem offenem 35 mm PBS-Petrischälchen, gefüllt mit 3 ml sterilem PBS um die optimale Feuchtigkeit während des Inkubierens zu gewährleisten, gestellt. Die große Petrischale wird mit einem Deckel wieder verschlossen. Nach 12 Tagen Inkubation in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit wird die Koloniegröße und -anzahl ermittelt. Vor dem Fixieren und der Färbung muß das allgemeine Koloniewachstum und die Morphologie in einem Umkehrmikroskop untersucht werden.

Entwässern und Fixieren

Methanol	Merck, Darmstadt
Aceton	Merck, Darmstadt
Filterpapier	StemCell Technologies, St. Katharinen
Polypropylenabstandshalter	StemCell Technologies, St. Katharinen
2,5 l Plastikbehälter mit festschließendem Deckel	

Die Kulturen beläßt man bis kurz vor der Dehydration im Inkubator, da das Collagen bei niederen Temperaturen instabil werden kann. Man entnimmt die Kammer-Träger einzeln oder in kleinen Mengen aus dem Brutschrank und beschriftet sie mit einem Bleistift oder Diamantschreiber. Die Objektträger werden dann in eine Methanol-Aceton-Fixierlösung (Volumenverhältnis 1 : 3), die sich in dem 2,5 l Plastikgefäß befindet, gebracht. Der Deckel wird um Verdunstungen zu vermeiden fest verschlossen.

Ohne die Kultur zu verletzen wird die Kammer entfernt, indem man an einer Ecke mit einer Zange die Gummiabdichtung wegzieht. Vorsichtig wird ein vorgeschchnittenes Polypropylenfließ auf den Objektträger gelegt. Darauf ein weißes Filterpapier, mit dem man die Flüssigkeit aufsaugt. Um die Absorption der Flüssigkeit anzustoßen tippt man das Filterpapier an, bis die Ecken feucht werden. Druck auf das Gel sollte vermieden werden, da Teile der Kultur herausgequetscht und verloren würden. Das Filterpapier muß entfernt werden, während man das Polypropylenfließ auf den Kulturen beläßt. Man legt die Objektträger in den 2,5 l Behälter, der mit 200 ml Fixierlösung gefüllt ist. Um sicherzugehen, daß die Objektträger völlig mit Fixierlösung bedeckt sind, sollten nicht mehr als 12 Objektträger in dem Behälter gleichzeitig entwässert werden. Den Deckel fest verschließen. Nach 20 min in der Methanol-Aceton-Lösung schwimmen die Polypropylenflöße hoch und hinterlassen zwei Gel-Quadrate auf dem Objektträger. Die Objektträger werden aus der Fixierlösung entnommen und 15 min luftgetrocknet. Die Kulturen können unverzüglich gefärbt oder bei 4 °C bis zur immunzytochemischen Färbung gelagert werden.

Färbung

Gebrauchslösungen:

0,05 M Tris/NacCl Puffer pH 7,6

0,05 M Tris/NacCl-Puffer / 5 % Humanserum

Maus-anti-human gp IIb/IIIa mit Puffer + 5 %-igem Humanserum auf 0,01 mg/ml verdünnen

Maus-anti-TNP Negativkontrolle mit Puffer + 5 %-igem Humanserum auf 0,005 mg/ml verdünnen

Ziege-anti-Maus IgG biotinyliert mit Puffer + 1 % BSA auf 10 µg/ml verdünnen

Avidin-Alkalische Phosphatasekonjugat mit Puffer + 1 % BSA auf 18 µg/ml verdünnen

Alkalische Phosphatase Substrat-Tabletten

Evan's Blau-Lösung 0,5 % w/v mit Methanol 1: 6 verdünnen

Alle Gebrauchslösungen müssen frisch hergestellt werden und innerhalb von 8 h verbraucht werden. Die alkalische Phosphatase-Substratlösung muß innerhalb einer Stunde verwendet werden.

Vorgehen:

Objektträger vor dem Färben auf Zimmertemperatur bringen (30 min). Alle Schritte der Färbung bei horizontaler Position der Objektträger durchführen. Man rehydriert die Kulturen auf dem Objektträger durch Zugabe von 1,5 ml Tris/NaCl-Puffer und beläßt diese bei Zimmertemperatur für 20 min. Der Puffer kann vorsichtig mit einer Waschflasche zugegeben werden. Alle weiteren Schritte sind bei Zimmertemperatur durchzuführen. Nach dem Entfernen des Puffers wird 0,5 ml Tris/NaCl-Puffer / 5 % Humanserum zugegeben. Die ganze Oberfläche der Kultur muß mit der Lösung bedeckt sein. Vorsichtig werden die Objektträger dreimal mit je 0,5 ml Tris/NaCl-Puffer / 5 % Humanserum versetzt und jeweils 3 min inkubiert. Danach werden 0,5 ml des primären bzw. des Kontroll-Antikörpers zugegeben und für 30 min belassen. Nach dem Entfernen der Färbelösung wird 0,5 ml Tris/NaCl-Puffer / 5 % Human Serum zugegeben. Die ganze Oberfläche der Kultur muß mit der Lösung bedeckt sein. Vorsichtig werden die Objektträger dreimal mit je 0,5 ml Tris/NaCl-Puffer / 5 % Humanserum versetzt und jeweils 3 min inkubiert. Mit 0,5 ml der Biotin-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG-Antikörperlösung wird dann 30 min inkubiert. Nach dem Entfernen des sekundären Antikörpers wird 0,5 ml Tris/NaCl-Puffer / 5 % Human Serum zugegeben. Die ganze Oberfläche der Kultur muß mit der Lösung bedeckt sein. Vorsichtig werden die Objektträger dreimal mit je 0,5 ml Tris/NaCl-Puffer / 5 % Humanserum versetzt und jeweils 3 min inkubiert. Mit 0,5 ml der Avidin-alkalischen Phosphatasekonjugatlösung wird anschließend 30 min inkubiert. Nach dem Entfernen des Puffers wird 0,5 ml Tris/NaCl-Puffer / 5 % Humanserum zugegeben. Die ganze Oberfläche der Kultur muß mit der Lösung bedeckt sein. Vorsichtig werden die Objektträger dreimal mit je 0,5 ml Tris/NaCl-Puffer / 5 % Humanserum versetzt und jeweils 3 min inkubiert.

Während der 30 min Inkubationszeit wird die alkalische Phosphatasesubstratlösung zubereitet:

Die Tris-Puffer-Tabletten werden zu der abgemessenen Wassermenge gegeben und bis zum Auflösen gevortext. Unter Zugabe der Naphthol-Substrattabletten wird bis zur schwachrosa-Färbung der Lösung gemischt.

Diese Substratlösung wird für 15 min auf die Objektträger (0,5 ml pro Objektträger) gegeben.

Nach dem Entfernen der Substratlösung wird 0,5 ml Tris/NaCl-Puffer / 5 % Humanserum zugegeben. Die ganze Oberfläche der Kultur muß mit der Lösung bedeckt sein. Vorsichtig werden die Objektträger dreimal mit je 0,5 ml Tris/NaCl-Puffer / 5 % Humanserum versetzt und jeweils 3 min inkubiert

Mit der 0,5 %-igen Evans Blau-Lösung wird 10 min gegengefärbt. Anschließend spült man von den Objektträgern wird mit destilliertem Wasser die Evans-Blau-Lösung ab.

Bei diesem Verfahren sind alle Inkubationsschritte im Dunkeln durchzuführen. Nach 30 min Lufttrocknen können die Objektträger in einem verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur oder bei 4 °C für längere Zeit aufgehoben werden.

5.4.2 Erscheinungsbild der CFU-Mk

Zuerst den Objektträger mit einem 5er Objektiv durchgehen und die Verteilung der Kolonien vermerken. Die Auszählung kann dann mit demselben Objektiv durchgeführt werden; das 10er Objektiv kann zur genaueren Beurteilung der Kolonien verwendet werden. Drei Arten (Kategorien) von Kolonien können in diesem Megakaryozytenassay identifiziert werden: reine Megakaryozytenkolonien (CFU-Mk), gemischte Mk-Kolonien (die zusätzlich zu Megakaryozyten andere Zelllinien enthalten) und Nicht-Mk-Kolonien.

Megakaryozyten und Thrombozyten, die Glykoprotein IIb/IIIa (CD41a) aufweisen, werden nach Fixierung und Färbung rosa. Die Gegenfärbung mit Evan's Blau läßt die Zellkerne unabhängig vom Zelltyp schwach blau erscheinen.

CFU-Mk zeigen sich als Gruppe von Zellen mit einer rosa Membranfärbung und blauem Kern. CFU-Mk-Kolonien reichen in der Größe von 3 bis zu mehreren hundert Megakaryozyten pro Kolonien. Es ist daher zweckmäßig, sie anhand der Zellgröße einzuteilen:

Klein	5 - 10 Zellen pro Kolonien
Mittel	11 - 49 Zellen pro Kolonie
Groß	ab 50 Zellen pro Kolonien

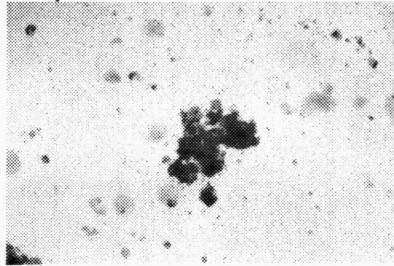


Abbildung 12

Dargestellt ist eine kleine CFU-Mk in 50x Vergrößerung.

Große Mk-Kolonien entstehen aus primitiven (frühen) Mk-Vorläuferzellen, wohingegen die kleineren Mk-Kolonien von reiferen gebildet werden.

Thrombozytenhaufen haben eine unregelmäßige Form und färben sich einheitlich rosa ohne sichtbare Kernfärbung. Da die Zellen innerhalb des CFU-Mk reifen, können Thrombozyten-ähnliche Fragmente die Kolonien umgeben. Einzelne Megakaryozyten können auch vorhanden sein, sollten aber nicht als Kolonien gezählt werden. Nicht-Mk-Kolonien (> 20 Zellen pro Kolonien) sind gewöhnlich aus der granulozytären und monozytären Zelllinie. Die Anzahl dieser Kolonien kann - falls gewünscht - festgehalten werden, wobei aber Megakaryozytenwachstumsmedien das optimale Wachstum der CFU-GM nicht fördern.

Gemischte Mk-Kolonien zeichnen sich durch das Vorhandensein von Nicht-Mk-Zellen und Megakaryozyten in derselben Kolonie aus.

6 Langzeitkultur-Assays zur Detektion primitiver Vorläuferzellen (LTC-IC-Assay)

Die murinen Feederzellen M₂10B₄ werden in RPMI 1640 / 10 % FCS und SL / SL in DMEM / 15 % FCS wie unter B 2.1. beschrieben kultiviert. Zugesezt wird jeweils mit der angegebenen Endkonzentration in Kultur bei M₂10B₄ G418 (0,4 mg/ml) und Hygromycin (0,06 mg/ml, Calbiochem) und bei SL/SL G418 (0,8 mg/ml) bzw. Hygromycin

(0,125 mg/ml). Bei Erreichen der Konfluenz werden die nicht-adhärenenten Zellen aus den Zellkulturflaschen entfernt und nach zweimaligem Waschen mit Hanks wird 10 ml Trypsin-EDTA-Lösung zum Ablösen der Zellen zugegeben. Nach 10 min bei 37 °C wird zum Abstoppen der Trypsinreaktion 1 ml FCS zugesetzt. Sodann werden die abtrypsinierten Zellen in 10 ml IMDM / 2 % FCS aufgenommen und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Nach zweimaligem Waschen mit 10 ml IMDM / 2 % FCS (1200 Upm, 10 min) wird das Zellpellet in 1 ml IMDM / 2 % FCS / DNase I (100 U/ml) resuspendiert. Nach Zellzählung wird die Zellsuspension auf $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt und mit 80 Gy bestrahlt. Die beiden bisher separat behandelten Zelllinien werden nun gemischt und bei 1200 Upm, 10 min abzentrifugiert. Das Mischzellpellet wird in humanem Langzeitkulturmedium (HLTM) so resuspendiert, daß 2 ml mit 3×10^5 Zellen in eine collagenbeschichtete Petrischale gegeben werden können. Bestrahlte Feederzellen werden verwendet um ein geeignetes Umfeld für die *in vitro* Langzeitkultur zu erhalten. Die Feederzellen werden bestrahlt um die Zellteilung zu stoppen aber noch immer die Produktion der essentiellen Stoffe für die Langzeitkultur der Vorläuferzellen zu gewährleisten. Die Wachstumsfaktorkonzentrationen, die von den Feederzellen produziert werden, müssen alle 2 Monate getestet werden. Man gebe in je 2 Petrischalen 3×10^5 Zellen der beiden bestrahlten Zelllinien. Der Überstand wird nach 24 h und 7 Tagen abgenommen und die Level der Wachstumsfaktoren M_210B_4 : G-CSF, IL-3 und SL/SL: SCF, IL-3 mittels ELISA bestimmt. Vor Versuchsbeginn werden HLTM-Medien als Zeitpunkt-0-Medien zur Kontrolle eingefroren. Feederzellen können problemlos eine Woche vor Gebrauch hergestellt werden. Bei älteren Zellen ist es empfehlenswert vor Gebrauch einen vollen Medienwechsel durchzuführen. Alle Bewegungen und Arbeiten an den Langzeitkulturen müssen vorsichtig durchgeführt werden, um keine Kontaminationen oder Zerstörungen an der adhärenenten Schicht zu verursachen. Vor dem Einsatz der „mixed feeder cells“ in die Petrischalen (10 x 35 mm = 8 cm²) müssen diese mit Rattenschwanzcollagen beschichtet werden. Die Schalen werden mit 1 ml Collagen aufgefüllt und nach 5 Sekunden wird das überschüssige Collagen bei einer neuen Schale weiterverwendet. Die benetzten Kulturschalen werden in der Sterilbank luftgetrocknet. Diese collagenbeschichteten Petrischalen können unter sterilen Bedingungen einige Tage aufbewahrt werden. Wöchentlich hat ein halber Mediumwechsel zu erfolgen und eine Betrachtung der Qualität und des Wachstums bzw. ungewöhnlicher Erscheinungen bei

der Kultur muß vorgenommen werden. Beim Medienwechsel wird das gesamte Medium einer einzelnen Kulturschale mit einer Pipette aufgenommen und das wegen unterschiedlicher Verdunstung variierende Volumen abgelesen. Mittels vorsichtigem Auf- und Abpipettieren wird eine homogene Durchmischung erreicht. Die Hälfte des Mediums (bei 2,5 ml Medienvolumen: 1,25 ml) einer Schale wird verworfen. Unter Benutzung einer neuen sterilen Einmalpipette wird diese Hälfte (1,25 ml) durch neues HLTM-Medium ersetzt. Die Zellen wurden wie beschrieben 6 Wochen bei 37 °C unter wöchentlichem halben Mediumwechsel kultiviert. Nach der Ernte aller Zellen werden diese in Methylzellulose (H4434) eingesetzt. Diese Kulturen werden 14 Tage im Methylzellulosemedium mit 30 % FCS und den rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren GM-CSF, EPO, SCF, IL-3 kultiviert, bevor die Kolonienzahl mittels eines Mikroskop (Leica, Wetzlar) bei 40x Vergrößerung ermittelt wurde (siehe B 5.).

Der LTC-IC-Gehalt der Zellsuspension wurde durch Limiting-Dilution-Analyse bestimmt. Zwischen 3 und 656 aufgereinigten CD34⁺, CD34⁺ CD84⁺ oder CD34⁺ CD84⁺ Zellen wurden eingesäht. Die LTC-IC-Ermittlung basiert auf der Zahl negativer Kulturschalen, d. h. Kulturen die keine Kolonie enthalten, die mittels Poissonstatistik und dem L-calc-Programm (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) erfolgt (Hogge *et al.*; 1996; Sutherland *et al.*, 1991; Eaves A und Eaves C, 1999).

C Ergebnisse

1 CD34-Subpopulationen

Als Nebenprodukt von regelmäßig in unserer Abteilung durchgeführten Leukapheresen und Elutriationen zur Monozytengewinnung standen uns größere Mengen an CD34⁺ Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender zur Verfügung. Die uns zur Verfügung stehenden Elutriationsfraktionen 57 ml/min bis 111 ml/min (s. B. 3.1.) enthielten mehr als 90 % der initial gesammelten CD34⁺ Zellen bzw. über 95 % der CD34⁺ CD38⁻ Zellen (n=3; Dr. Burkhard Hennemann, Abteilung für Hämatologie).

Ziel war es, die bisher im Vergleich zu den übrigen Stammzellquellen weniger gut charakterisierte CD34-Population in nicht mobilisiertem peripherem Blut gesunder Spender näher zu untersuchen. Um diese Population, die in den folgenden Untersuchungen verwendet wird, zu charakterisieren, wurden verschiedene Subpopulationen und deren prozentuales Verhältnis bestimmt. Vorläuferzellsubpopulationen sind funktionell charakterisiert, z. B. als Stammzelle, multipotente Vorläuferzelle und unipotente CFU. Alternativ lassen sich Vorläuferzellsubpopulationen durch ihren Phänotyp eingrenzen (Abbas *et al.*, 1996). Stammzellen sollen demnach CD34⁺ CD38⁻ oder CD34⁺ KDR⁺ sein (Messner, 1998; Ziegler *et al.*, 1999). Lymphatische Vorläuferzellen sind durch CD34 und CD10 oder CD19 charakterisiert (Galy *et al.*, 1995). Leider sind die Zellen eines bestimmten Immunphänotyps nicht vollständig kongruent mit den funktionell charakterisierten Subpopulationen (Ziegler *et al.*, 1998). Zur Charakterisierung der Vorläuferzellpopulation des peripheren Blutes bei gesunden Spendern werden folgende Subpopulationen durchflußzytometrisch untersucht.

	Peripheres Blut
	nicht mobilisiert
CD34 ⁺ CD38 ⁻	0,23 ± 0,03
CD34 ⁺ CD10 ⁺	2,55 ± 1,83
CD34 ⁺ CD19 ⁺	1,75 ± 1,45
CD34 ⁺ CD64 ⁺	6,4 ± 4,8
CD34 ⁺ CD32 ⁺	37,57 ± 15,64

CD34-Subpopulationen in „steady-state“ peripherem Blut (Elutriationsfraktionen).

Die Tabelle gibt jeweils den Anteil in Prozent ± der Standardabweichung der jeweiligen Subpopulation innerhalb der CD34-Zellen an (n = 8).

Zum Vergleich wurden dieselben Subpopulationen in anderen Geweben untersucht, die als Stammzellquelle dienen können. Mittels durchflußzytometrischer Mehrfarbenanalyse wurden die prozentualen Werte von Subpopulationen humaner CD34⁺ Vorläuferzellen in den einzelnen Stammzellquellen Knochenmark, Nabelschnurblut und mobilisiertem peripheren Blut bestimmt.

	Mobilisiertes Peripheres Blut	Nabelschnurblut	Knochenmark
	n=8	n=7	n=4
CD34 ⁺ CD38 ⁻	0,99 ± 0,06	0,9 ± 0,08	0,77 ± 0,41
CD34 ⁺ CD10 ⁺	10,94 ± 0,1	17,04 ± 5,57	18,45 ± 6,39
CD34 ⁺ CD19 ⁺	1,96 ± 2,2	4,98 ± 3,03	6,47 ± 3,36
CD34 ⁺ CD64 ⁺	1,93 ± 3,3	2,79 ± 1,72	8,49 ± 1,73
CD34 ⁺ CD32 ⁺	12,43 ± 1,81	23,49 ± 7,58	26,85 ± 7,08

CD34-Subpopulationen.

Die Tabelle gibt jeweils den Anteil in Prozent ± Standardabweichung der jeweiligen Subpopulation innerhalb der CD34-Zellen an.

Bei den primitiven CD34⁺ CD38⁻ Vorläuferzellen war der Prozentgehalt bei mobilisiertem peripheren Blut mit 0,99 % ± 0,06 % am höchsten, wobei aber auch Knochenmark (0,77 % ± 0,41 %) und Nabelschnurblut (0,9 % ± 0,08 %) einen ca. vierfachen Wert im Vergleich zu peripherem Blut gesunder Spender hatten.

In peripherem Blut gesunder, meist männlicher, Spender konnte ein erhöhter Gehalt an CD34⁺ CD32⁺ Vorläuferzellen im Vergleich zu den anderen Stammzellquellen festgestellt werden (37,57 % ± 15,64 %), wobei aber die Standardabweichung relativ hoch war, so daß der Unterschied nur im Vergleich zu mobilisiertem peripheren Blut signifikant war. Bei granulo-monozytären Vorläuferzellen CD34⁺ CD64⁺ war der Gehalt in Knochenmark (8,49 %) gegenüber mobilisiertem peripheren Blut (1,93 %) erhöht. Myeloische Vorläuferzellen hatten mit 6,4 % bei gesunden Spenderproben und Nabelschnurblut (2,79 %) in den beiden anderen Stammzellquellen Anteile die zwischen Knochenmark und mobilisiertem peripherem Blut lagen.

Bei lymphatischen Vorläuferzellen CD34⁺ CD10⁺ ist der höchste Prozentwert in Knochenmark detektierbar (18,45 %), während unmobilisiertes peripheres Blut mit nur 2,55 % den niedrigsten Gehalt aufweist. Verglichen mit mobilisiertem peripheren Blut

war bei lymphatischen Vorläuferzellen in gesunden Spendern nur ein Viertel des Gehalts vorhanden. Im Knochenmark waren die Anteile der CD10 und CD19 koexprimierenden CD34-Populationen am höchsten, was auf einen auffallend großen Bestand von Vorläuferzellen mit lymphatischer Differenzierungsrichtung hinweist.

CD34-Zellen aus Knochenmark, Nabelschnurblut, peripherem Blut mobilisierter und nicht mobilisierter Spender sind nicht gleichartig bezüglich ihrer Vorläuferzellsubgruppen und müssen daher gesondert betrachtet werden.

2 CD84 und Vorläuferzellen

2.1 CD84-Expression auf CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen

Daten zur Expression von CD84 auf differenzierten hämatopoetischen Zellen wie Makrophagen, Lymphozyten und Megakaryozyten sind bekannt (de la Fuente *et al.*, 1997; Andreesen *et al.*, 1998, Krause SW *et al.*, 2000). Der im Jahr 1985 klonierte monoklonale Antikörper Max.3 bindet und erkennt CD84 spezifisch (Krause SW *et al.*, 2000). Der Max.3-Antikörper erkennt auf Makrophagen ein Glykoprotein von 60 - 80 kDa. Für Max.3-Antikörper ist eine Kreuzreaktivität mit Megakaryozyten und Thrombozyten beschrieben (Andreesen *et al.*, 1986). Um die Expression von CD84 auf Vorläuferzellen zu untersuchen, wurden humane CD34⁺ hämatopoetische Vorläuferzellen mit dem monoklonalen Antikörper Max.3 gefärbt. Die Färbung mit dem Max.1-Antikörper, einem makrophagenspezifischen Antikörper aus der Reihe der Max-Antikörper, der Carboxypeptidase M spezifisch erkennt, auf den CD34-Zellen war negativ. CD84 konnte auf Subpopulationen von CD34⁺ peripheren Blutzellen und Knochenmarkszellen nachgewiesen werden (Abbildung 13).

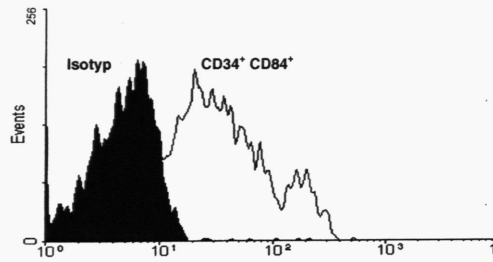


Abbildung 13

Repräsentatives FACS-Profil von PBMC nach CD34-Aufreinigung mittels Immunaффinitätssäulen. Gezeigt sind nur CD34⁺ Zellen. (Gating entsprechend den ISHAGE-Richtlinien)

Der höchste Gehalt von CD84⁺ Zellen konnte auf den Vorläuferzellen von Nabelschnurblut ($65,7 \pm 18,9\%$) und dem „steady state“ peripheren Blut von gesunden Spendern ($63,6 \pm 4,7\%$) gefunden werden. Weniger CD84 zeigten die Vorläuferzellen von mobilisiertem Blut und Knochenmark ($45,8 \pm 1,5\%$ und $34,1 \pm 8,1\%$) (Abbildung 14).

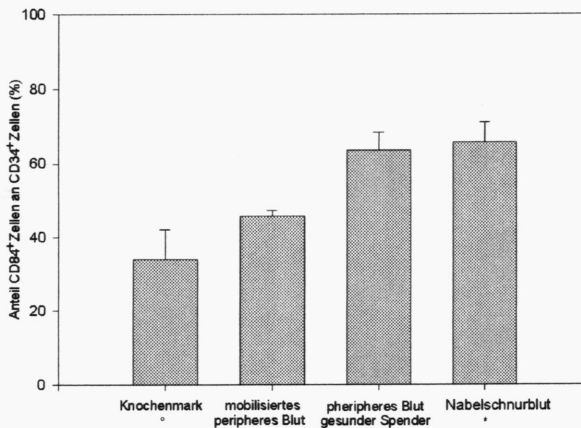


Abbildung 14

CD84-Expression auf hämatopoetischen Vorläuferzellen.

Vergleich des Anteils CD84⁺ Zellen innerhalb der jeweiligen CD34⁺ Vorläuferzellpopulation in „steady state“ peripheren Blut, mobilisiertem peripheren Blut, Knochenmark und Nabelschnurblut (* n=3, ° n=4)

Morphologische Analysen von Zytospins gesorteter CD84⁺ und CD84⁻ CD34-Zellen im Laser Scanning Cytometer zeigten keinerlei morphologische Unterschiede zwischen den beiden Subpopulationen. Mittels dieses mikroskopbasierten Instrumentes war es möglich, die Zellen auf einem Objektträger zu relokalisieren, visuell zu betrachten, nachzufärben und wieder fluoreszenzbezogen vermessen zu können. Durch die Speicherung von Bild, Position und Zeit konnten einzelne Zellen genau registriert werden. Dieses Durchflußzytometrie und Bildverarbeitung vereinende Gerät ermöglichte die Relokation von Zellen innerhalb 6 µm. Beide Subpopulationen zeigten undifferenzierte blastenähnliche Morphologie. Es konnte keinerlei unterscheidendes Charakteristikum für doppelt positive CD34⁺ CD84⁺ Zellen gefunden werden (Abbildung 15).

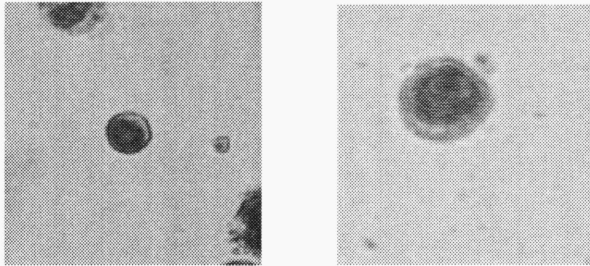


Abbildung 15

Korrelation der CD84-Antigenexpression CD34⁺-Vorläuferzellen mit der Zellmorphologie (links 60x, rechts 40x Vergrößerung).

Mittels eines LSC wurde die Zellmorphologie *fluorochrommarkierter Zellen nach Pappenheimfärbung* untersucht. Die beiden kleinen blastenähnlichen Zellen wiesen kein morphologisches Unterscheidungsmerkmal zur Differenzierung der CD34⁺ CD84⁻ von den doppelpositiven CD34⁺ CD84⁺ Zellen auf.

2.2 Analyse der Oberflächenmarker CD34⁺ CD84⁺ Zellen

Unter Verwendung der durchflußzytometrischen Vierfarbenanalyse wurde die CD34⁺ CD84⁺ Population auf die Expression von Oberflächenmarker untersucht. CD34⁺ Vorläuferzellen sind sehr heterogen und beinhalten neben pluripotenten Stammzellen auch weiter differenzierte Vorläuferzellen (Dick *et al.*, 1997; Keller *et al.*, 1992a). Oberflächenmarker wie CD64, CD41a, CD19 und CD71 identifizieren Populationen, die für uniliniäre oder bipotente Vorläuferzellen einer bestimmten Differenzierungsrichtung angereichert sind (Olweus *et al.*, 1996). Antigene wie CD38 werden verwendet, um hoch angereichert primitive Vorläuferzellen zu isolieren (Terstappen *et al.*, 1991).

Es wurden CD10, CD19, CD38, CD41a, CD64 und CD71 untersucht. Die Expression von CD32, CD41a, CD64 oder CD71 konnte auf CD84⁺ Vorläuferzellen detektiert werden. Dies zeigt, daß CD84⁺ Vorläuferzellen zu den verschiedenen hämatopoetischen Differenzierungsrichtungen wie myelo-monozytär (CD64), erythroid (CD71^{high}) oder megakaryozytär (CD41a) zu rechnen sind. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für CD10 und CD19 gewonnen. Die meisten der CD10⁺ und CD19⁺ B- und T-lymphoiden Vorläuferzellen exprimierten CD84. Nahezu alle CD34⁺ CD84⁺ Zellen exprimierten CD38 auf ihrer Oberfläche, was auf einen eher weiter differenzierten Status dieser Zellen hinweist. Dagegen waren CD38⁻ bzw. CD38^{dim} Vorläuferzellen meist CD84 negativ. Bei diesen 4-Farben-Messungen wurden jeweils 10000 CD34⁺ Zellen analysiert, wobei aber trotz dieser hohen Zahl CD34⁺ Zellen im Durchschnitt nur wenige Zellen auch CD38⁻ waren (n=3).

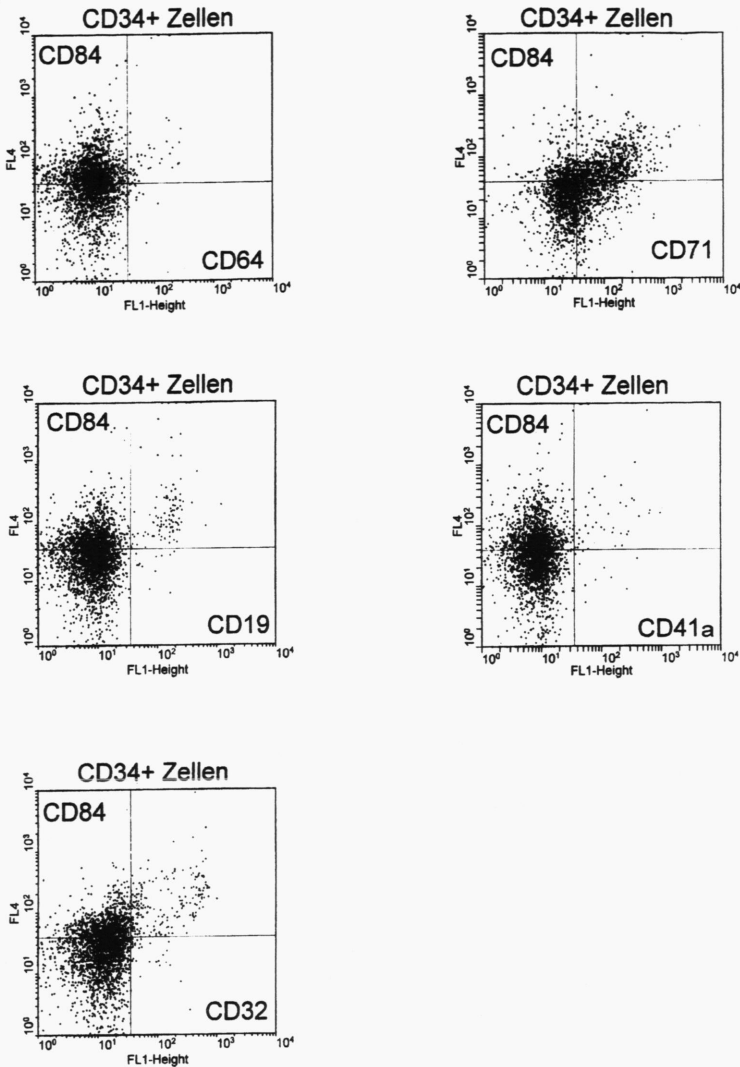


Abbildung 16

Analyse der CD84-Expression auf Subpopulationen CD34⁺ Vorläuferzellen.

Gezeigt ist die Expression von CD84 auf CD34⁺ Zellen in Gegenfärbung mit CD19, CD32, CD41a, CD64, CD71. Nur SSC^{low} CD34⁺⁺ Zellen wurden mittels Vierfarben-FACS analysiert.

2.3 Klonogene Assays von CD34⁺ CD84⁺ oder CD34⁺ CD84⁻ Zellen

Die Fähigkeit hämatopoetischer Zellen in semisoliden Medien typische Kolonien zu bilden, wird im Colony-Assays verwendet, um das Differenzierungspotential der hämatopoetischen Vorläuferzellen zu bestimmen. Um zu ermitteln, ob die CD84-Expression auf bestimmte hämatopoetischen Differenzierungslinien beschränkt ist, wurden Colony-Assays für myeloische, erythroide und megakaryozytäre Vorläuferzellen durchgeführt. CD84 exprimierende Vorläuferzellen bildeten hauptsächlich erythroide Kolonien (BFU-E und CFU-E). Nur wenige myeloische und gemischte Kolonien wurden beobachtet (Abbildung 18). Deutlich war aber, daß CD34⁺ CD84⁻ Zellen signifikant mehr CFU-GEMM als CD34⁺ CD84⁺ Zellen bilden konnten (T-Test).

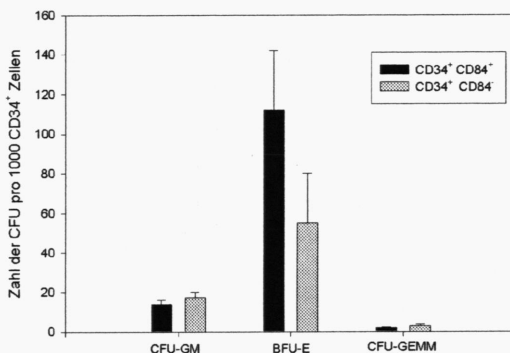


Abbildung 17

In vitro Koloniebildungsfähigkeit von Subpopulationen von „steady state“ CD34⁺ Zellen.

1 ml-Kulturen mit 1000 FACS-gesorteten CD84⁺ oder CD84⁻ Zellen wurden im semisoliden Methylzellulose-Assay mit 30 % FCS, GM-CSF (10 ng/ml), SCF (50 ng/ml) IL-3 (10 ng/ml) und 3 U/ml EPO 14 Tage kultiviert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der gezählten Kolonien von 3 unabhängigen Experimenten. CD84⁻ CD34⁺ Zellen produzierten weniger Kolonien. Bezogen auf die Gesamtzahl der Kolonien war der Prozentgehalt myeloider und gemischter Kolonien höher.

CD34⁺ Vorläuferzellen bildeten 79 ± 33 megakaryozytäre Kolonien (CFU-Mk) pro 1000 in Megakaryozyten-Assays eingesetzte Zellen ($n=4$). Beide CD84-Subpopulationen bildeten in diesem Experiment mehr CFU-Mk als CD34⁺ Zellen, wobei aber der Unterschied beider Subpopulationen bezogen auf die CFU-Mk-Gesamtzahl nicht signifikant war. Eine ähnlich hohe Zahl von megakaryozytären Kolonien, wie die erythrozytären Kolonien, gingen aus 10^3 CD34⁺ CD84⁺ Zellen hervor. Die CD84⁻-Zellen

(131 ± 60 CFU-Mk pro 1000 eingesetzte Zellen) bildeten jedoch kleinere Kolonien als die $CD84^+$ Zellen (110 ± 78 CFU-Mk pro 1000 eingesetzte Zellen). 65 % der von den $CD84^+$ Vorläuferzellen hervorgerufenen CFU-Mk waren von kleiner oder mittlerer Größe, die Mehrheit der CFU-Mk der $CD84^+ CD34^+$ Population war jedoch groß mit hohem proliferativen Potential (Abbildung 18).

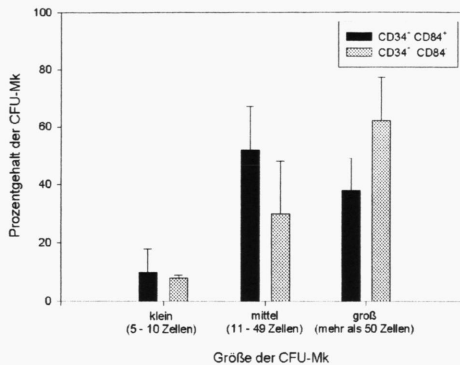


Abbildung 18

Koloniengröße der CFU-Mk $CD84^+$ und $CD84^+ CD34^+$ Vorläuferzellen.

500 $CD34^+ CD84^+$ bzw. $CD34^+ CD84^-$ wurden 12 Tage im Megakaryozyten-Assay mit TPO (50 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml) und IL-6 (10 ng/ml) kultiviert. Nach Dehydrierung und Fixierung wurden die Kolonien mit einem Maus-anti-human Gp IIb/IIIa-Antikörper (APAAP-Färbetechnik) gefärbt. Rosagefärbte Kolonien wurden gezählt und die Zahl pro Kolonie bestimmt. Die Mittelwerte von 4 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung sind gezeigt.

2.4 Langzeitkulturen von $CD84^+$ und $CD84^+ CD34^+$ Vorläuferzellen

Langzeitkulturen sind geeignet, um zwischen Vorläuferzellen mit hohem Proliferationspotential und weiter differenzierten Vorläuferzellen mit eingengerter proliferativer Kapazität zu unterscheiden (Roberts *et al.*, 1997). FACS-sortierte $CD34^+ CD84^+$ bzw. $CD34^+ CD84^-$ Zellen wurden in Medium mit IL-3, G-CSF, SCF, IL-6 vier Wochen lang kultiviert, um das Proliferationspotential dieser beiden Subpopulationen zu ermitteln. Wöchentlich (ab der 2. Woche) wurden die Zellen gezählt und in klonogene Assay eingesetzt. In diesen Langzeitkulturen zeigten $CD84^+$ Zellen eine deutlich erhöhte Proliferationskapazität im Vergleich zur $CD84^+$ Population (Abbildung 19 B). Aus $CD84^+$ Zellen gingen auch mehr sekundäre Kolonien hervor als aus $CD84^+$. Während

CD34⁺ CD84⁺ Zellen nur wenige CFU innerhalb der ersten 2 Wochen bildeten, produzierten CD84⁻ Vorläuferzellen während der ganzen vierwöchigen Kulturdauer CFU (Abbildung 19 A).

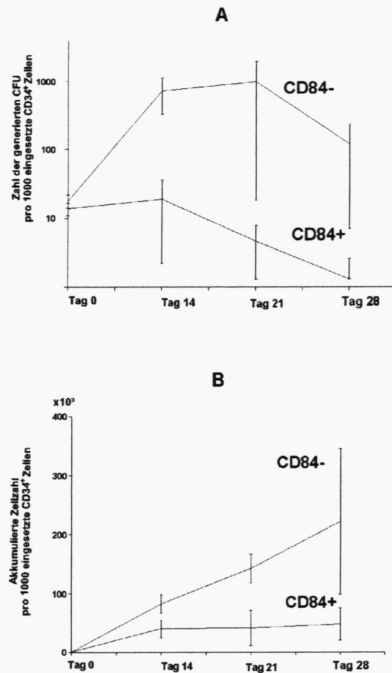


Abbildung 19

Die Zahl von CFU-GM (A) und Gesamtzellzahl (B) in flüssiger Langzeitkultur von CD84⁺ / CD84⁻ „steady state“ CD34-Vorläuferzellen.

In die Kulturen wurden 1000 CD84⁺ oder CD84⁻ Zellen eingesetzt (Tag 0) und in Medium mit G-CSF (100 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), SCF (100 ng/ml) kultiviert. Wöchentlich (nach der 2. Woche) wurden Zellen entnommen und in Methylzellulose-Assays eingesetzt. Die restlichen Zellen wurden weiter kultiviert.

Die Zellzahl am jeweiligen Zeitpunkt ergibt sich als kumulative Zahl von neugenerierten Zellen und den früher produzierten Zellen. Mittelwerte aus vier Experimenten sind angegeben. Die Errorbars zeigen die Standardabweichungen.

2.4.1 LTC-IC-Frequenz in CD34⁺ CD84⁻ bzw. CD84⁺ CD34⁺ Vorläuferzellpopulationen

Im long-term culture initiating cell-Assay (LTC-IC-Assay) werden frühe primitive Vorläuferzellen und deren Koloniebildungsfähigkeit überprüft (siehe B. 6.). Die bereits für eine Zellreihe determinierten Vorläuferzellen gehen während des Assays (6 Wochen) zugrunde, während die sehr frühen, weniger differenzierten Vorläuferzellen überleben. Mit Hilfe dieses Assays werden Vorläuferzellen aufgrund ihrer Fähigkeit hämatopoetische Zellklone zu bilden, detektiert. Die Bestimmung der LTC-IC-Frequenz kann verwendet werden, um den Gehalt primitiver Zellen in einer Zellpopulation festzustellen. Mittels Limiting-Dilution-Analyse wurde die LTC-IC-Frequenz für CD34⁺ Zellen im Vergleich zu CD34⁺ CD84⁺ bzw. CD34⁺ CD84⁻ Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender ermittelt. Hierzu wurden jeweils zwischen 3 und 656 aufgereinigte Zellen eingesät. Die LTC-IC-Ermittlung in „Limiting-Dilution“ basiert auf der Zahl positiver Kulturschalen, d. h. Kulturen die mindestens eine Kolonie enthalten, die nach der Poissonschen Verteilung errechnet werden (L-calc-Programm, StemCell Technologies; Eaves A und Eaves C, 1999). Die durchschnittliche LTC-IC-Frequenz wurde in 3 unabhängigen Versuchen festgestellt (Abbildung 21). Wie erwartet, war die LTC-IC-Frequenz in der CD34⁺ CD84⁺ Zellpopulation (1 in 942) im Vergleich zur CD34⁺ Population (1 in 332) erniedrigt. CD34⁺ CD84⁻ Zellen enthielten dagegen noch mehr LTC-IC (1 in 183), was einer fast doppelten Anreicherung im Vergleich zur gesorteten CD34⁺ Zellpopulation darstellt. Diese Ergebnisse bestätigen die ausgeführten Ergebnisse der Langzeitkultur.

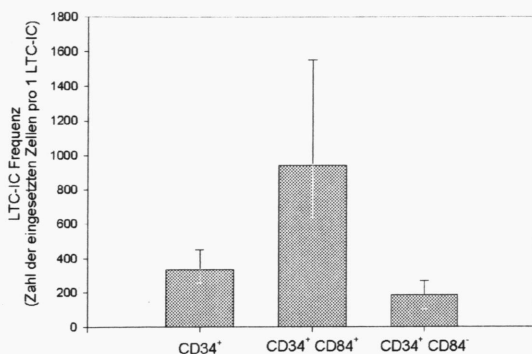


Abbildung 20

Limiting Dilution Analyse (LTC-IC) bei CD34⁺-Subpopulationen.

CD34⁺-Zellsubpopulationen wurden mittels FACStar^{Plus} sortiert und in Limiting Dilution auf Stromazellen kultiviert. Nach 5 Wochen wurden die geernteten Zellen in Colony-assays eingesetzt. Die CFU-Zahl wurde nach 14 Tagen ermittelt (n=3).

2.4.2 CD84-Expression bei *in vitro* Kultivierung

Die *in vitro* Kultur und Proliferation von CD34⁺ Zellen in Medium mit Wachstumsfaktoren wird durch den Differenzierungsprozeß der weiter differenzierten Vorläuferzellen zu reifen Effektorzellen begleitet (Landsdorp *et al.*, 1992). Die *in vitro* Kultur hämatopoetischer Zellen kann daher verwendet werden, die Regulation von Oberflächenmarkern während der Differenzierung zu untersuchen. Um zu ermitteln, ob CD84 auf der CD84-negative Vorläuferzellpopulation im Laufe der Differenzierung hochreguliert wird, wurden CD84⁻ CD34⁺ Zellen isoliert und in serumfreien Medium kultiviert. Eine Reanalyse der gesorteten CD84⁻ CD34⁺ Zellen zeigte, daß über 98 % der Zellen CD34 exprimierten, während weniger als 5 % der Zellen CD84⁺ waren.

Die kultivierten Zellen wurden nach 24, 48 und 72 h entnommen und die Expression von CD84 und CD34 bestimmt. Nach 72 h waren 24 % der Zellen CD34⁻ und 95 % der vorhandenen CD34⁺ Zellen exprimierten CD84 auf der Oberfläche. Dies zeigt, daß praktisch alle CD34⁺ Vorläuferzellen CD84 im Verlauf der *in vitro* Differenzierung und Proliferation hochregulieren (Abbildung 22). Die Zahl der in serumfreien Medium unter Zusatz von IL-3, IL-6, G-CSF, FL und SCF generierten Zellen wurde nach 24, 48 und 72 h bestimmt (siehe B. 4.). Ausgehend von den CD84⁻ CD34⁺ Zellen wurden im

Vergleich zur CD34⁺ und CD84⁺ CD34-Zellpopulation zwar mehr Zellen gebildet, wobei aber der Unterschied nicht signifikant war (s. folgende Tabelle).

	Zellzahl	Standardabweichung
lebende Zellen		
0 h	999	1
24 h	983	545
48 h	1086	297
72 h	7440	4338
CD34⁺ Zellen		
0 h	999	1
24 h	948	511
48 h	998	245
72 h	5627	3154
CD34⁺ CD84⁺ Zellen		
24 h	444	161
48 h	757	69
72 h	5306	2925

Zahl generierter Zellen bei den Kultivierungsexperimenten zur Evaluierung der CD84-Expression auf CD34⁺ Zellen in vitro.

CD34⁺ CD84⁺ wurden mittels Durchflußzytometrie sortiert und für 72 h in serum-freien Medium mit IL-3, IL-6, SCF, FL, G-CSF kultiviert. Nach 24, 48, 72 h wurde durchflußzytometrisch die Expression von CD34 und CD84 ermittelt. Die Mittelwerte ± Standardabweichung der gezählten lebenden Zellen (pro 1000 eingesetzte Zellen) von 3 unabhängigen Experimenten sind angegeben.

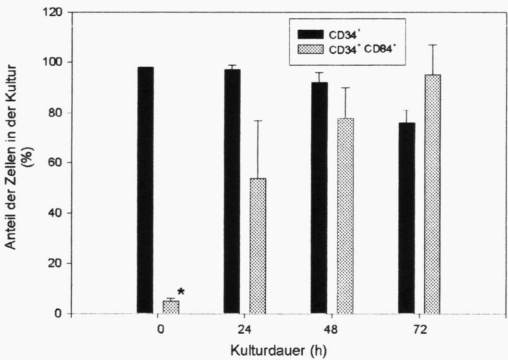


Abbildung 21

Kinetik der CD84-Expression auf CD34⁺ Zellen bei in vitro Kultivierung.

CD34⁺ CD84⁺ wurden mittels Durchflußzytometrie sortiert und für 72 h in serum-freien Medium mit IL-3, IL-6, SCF, FL, G-CSF kultiviert. Nach 24, 48, 72 h wurde durchflußzytometrisch die

Expression von CD34 und CD84 ermittelt. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten (* n=2) sind angegeben.

2.4.3 Blockierung von CD84 in Zellkulturen

Um einen eventuellen Einfluß des anti-CD84-Antikörpers (MAX.3) auf die Proliferation von Zellen bei der *in vitro* Kultivierung von CD34-Zellen durch Blockierung von CD84 zu ermitteln, wurde dialysierter MAX.3 Maus-anti-human-Antikörper zugesetzt. Es zeigte sich weder morphologisch in Zytospins noch in der Anzahl der generierten Zellen ein Unterschied zu den mit Isotyp oder mit einem Antikörper gegen CD15 kultivierten Zellen. Durch Zusatz des anti-CD84-Antikörpers (MAX.3) ergab sich also kein signifikanter Effekt auf die Kultur von CD34-Zellen in diesem Langzeitkultur-Assay. Da sich bei diesem in Triplikaten durchgeführten Versuch (n=1) kein Unterschied bezüglich Morphologie und generierter Zellzahl ergab, wurden diese Blockierungsstudien nicht weiter durchgeführt, insbesondere vor dem Hintergrund, daß ähnliche Blockierungsstudien bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen nicht erfolgreich waren (persönliche Mitteilung von PD Dr. Marina Kreutz, Universitätsklinikum Regensburg).

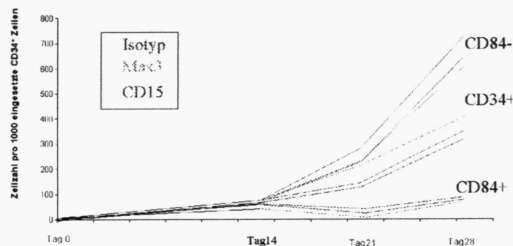


Abbildung 22

Zahl der durch gesortete CD34-Zellen in Langzeitkulturen generierten Zellen unter Zusatz der Antikörper gegen CD84, CD15 und Isotyp.

3 Einfluß hemmender Faktoren auf die Hämatopoese

3.1 Untersuchung von Rezeptoren auf Einzelzellebene

Untersuchungen zur Expression von Zytokinrezeptoren werden durch folgende Faktoren stark erschwert: Zum einen sind die CD34⁺ Vorläuferzellen ein sehr heterogenes

Gemisch aus Zellen mit unterschiedlichem Differenzierungs- und Proliferationspotential, zum anderen sind viele Zytokinrezeptoren nur sehr schwach auf den Zellen exprimiert. Zum Teil sind die Rezeptoren nicht durchflußzytometrisch detektierbar, da das untere Detektionslimit des FACS bei ca. 500 Rezeptoren pro Zelle liegt. Erste durchflußzytometrische Untersuchungen mit monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern gegen die Rezeptoren von TGF- β , MIP-1- α und IFN- γ verliefen daher erfolglos. Die Rezeptoren waren weder auf Tumorzelllinien (?) noch auf CD34⁺ Primärzellen nachweisbar. Wir untersuchten daher das Expressionsmuster der Rezeptoren auf mRNA-Ebene in Einzelzellen. Durchflußzytometrische 4-Farben-Analysen für die angegebenen Rezeptoren gelangen zwar in Zelllinien, konnten aber auf CD34-Zellen aufgrund eines zu hohen Backgrounds nicht reproduzierbar durchgeführt werden. Für diese Untersuchungen standen keine durchflußzytometrisch geeigneten monoklonalen anti-human Antikörper zur Verfügung. Der Nachweis von den verschiedenen Rezeptoren gelang jedoch in Einzelzellen von Zelllinien.

Da es sich bei der CD34-Population um ein heterogenes Zellgemisch handelt und manche Rezeptoren sich auf Proteinebene nur schlecht untersuchen lassen, wurden die Zellen zur Detektion von Zytokinrezeptoren auf Einzelzebene untersucht.

Von besonderem Interesse waren die Rezeptoren für IFN- γ , TGF- β und MIP-1- α , da deren Expression möglicherweise von entscheidender Bedeutung für die *in vitro* Kultivierung primitiver humaner Vorläuferzellen ist.

Die Einzelzellen werden durchflußzytometrisch in PCR-Gefäße mittels eines FACStar^{Plus} sortiert. Nach der Isolation der mRNA und Transkribierung zur cDNA wird eine unspezifische Amplifikation durchgeführt. Anschließend werden die jeweiligen Rezeptoren in einer nested-PCR nachgewiesen, wobei die entsprechenden Positiv- und Negativ-Kontrollen mitgeführt werden.

Die optimalen Bedingungen (pH, MgCl₂-Konzentrationene) für die Primerpaare wurden zuvor mittels geeigneter Zelllinien (Beispiel: Abb. 25) bestimmt und entsprechend im folgenden verwendet. Wenn bei der Zelllinienkontrolle ein Nachweis des entsprechenden mRNA-Moleküls aus bis zu einer 1/2 Zelle möglich war, so war die Sensitivität für die Durchführung dieser PCR-Methode auf Einzelzellen gegeben (Verwendung als Positivkontrolle) (siehe B. 2.3.4). Wenn die Positivkontrollen positiv sind, so heißt dies, daß die PCR sensitiv genug war und die PCR-Reaktion funktioniert hat. Die Negativ-

kontrollen garantieren eine kontaminationsfreie spezifische Amplifikation bei der Reaktion. Es sollte sich also ein Muster ergeben, welche Zelle aus welcher Subpopulation welche Rezeptoren gleichzeitig exprimiert und welche nicht.

Bei der Untersuchung von KG-1 Einzelzellen mittels der Einzelzell-RT-PCR-Technik konnte in den sortierten Zellen β -Actin nachgewiesen werden. Der Nachweis von β -Actin in den Zellen dient als positive Kontrolle für eine erfolgreiche Isolierung der Zelle sowie eine ausreichende RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.

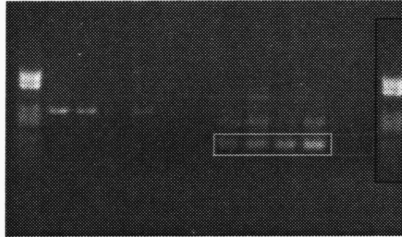


Abbildung 23

Agarosegel zum Nachweis von CCRI auf cDNA der Zelllinie U266 in einer nested-PCR (bis zur Nachweisgrenze von $\frac{1}{2}$ Zelle) nach Optimierung der PCR-Bedingungen. (Molekulargewichtsstandard, Negativkontrollen und eingesetzte cDNA in verschiedenen Verdünnungsstufen)



Abbildung 24

Fotographische Aufnahme eines Agarosegels zum Nachweis einzelner Rezeptoren auf Einzelzellen.

Auf β -Actin-positiven $CD34^+ CD10^+$ Zellen konnte wie in den Positivkontrollen $CD34$ nachgewiesen werden. (Molekulargewichtsstandard, Negativkontrollen und Positivkontrollen)

Die Anwendung der Einzelzell-PCR-Methode auf $CD34^+$ Vorläuferzellen ergab folgende Resultate:

Von zwölf untersuchten $CD34^+$ Zellen waren acht (75 %) Zellen für β -Actin und $CD34$ positiv. Drei der β -Actin-positiven Zellen exprimierten CCRI auf RNA-Ebene. Eine Expression von CCRV wurde auf drei weiteren der β -Actin-positiven Zellen nachge-

wiesen. Vier der β -Actin-positiven Zellen waren positiv für IFN- γ R. Eine der isolierten CD34-Einzelzellen exprimierte auf RNA-Ebene TGF- β RI. Von 18 sortierten CD34⁺ CD10⁺ lymphatischen Vorläuferzellen exprimierten 15 β -Actin und CD34. Die Expression von TGF- β 1, TGF- β RI, TGF- β RII, TGF- β RIII, MIP-1- α , CCRI, CCRIV, CCRV, IFN- γ und IFN- γ R konnte in keiner CD34-Zelle gezeigt werden, obwohl der Nachweis auf Zelllinien mit ausreichender Sensitivität - mit bis zu $\frac{1}{2}$ Zelle - möglich war.

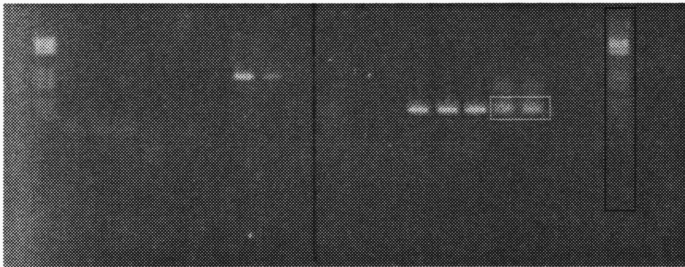


Abbildung 25

Fotographische Aufnahme zum Nachweis von CCRI auf CD34⁺ CD38⁻ Zellen.

In einer nested-PCR wird cDNA von Einzelzellen eingesetzt um CCRI nachzuweisen, wobei hier drei von sechs Zellen positiv sind. (Molekulargewichtsstandard, Negativkontrollen und Positivkontrollen der niedrigsten Verdünnungsstufen)

3.2 Uniliniäre Differenzierung

Alle Zellen des hämatopoetischen Systems stammen von pluripotenten Stammzellen ab, aus diesen gehen sie sukzessive durch Differenzierung hervor. Dieses System der Hämatopoese wird durch stimulierende und inhibierende Faktoren reguliert. Es handelt sich also vermutlich um ein reguliertes Gleichgewicht, bei dem sowohl positiv- als auch negativregulierende Zytokine eine Rolle spielen. Über die positiv regulierenden Zytokine wie G-CSF und TPO ist viel bekannt, wohingegen bei negativ regulierenden Faktoren, wie z. B. IFN- γ , MIP-1- α und TGF- β , wenig bekannt ist. Insbesondere der Einfluß dieser Faktoren auf linienspezifische Differenzierungsprozesse ist weitgehend ungeklärt. Um möglichst viele störende Faktoren auszuschließen und vor allem Zellen mit nur einer Differenzierungsrichtung zu generieren, anhand derer man den Einfluß der inhibierenden Zytokine untersuchen kann, wurden uniliniäre Kulturbedingungen gewählt.

Für fast alle Blutzelllinien besteht unter bestimmten Kulturbedingungen in serumfreiem Medium die Möglichkeit, Zellen uniliniär differenzieren zu können.

Die hämatopoetischen Vorläuferzellen und Stammzellen sind in der CD34-Population des peripheren Blutes und Knochenmarks enthalten. Diese CD34-Zellen sind eine heterogene Zellmischung, deren Mehrheit sich bereits in der fortgeschrittenen Differenzierungsphase befindet. Voraussetzung für uniliniäre Kulturen sind jedoch weitgehend undifferenzierte Vorläuferzellen, die über das Potential zur Differenzierung in die gewünschte Zelllinie verfügen. Um also eine möglichst reine, und von Zellen mit bereits festgelegtem Linienpotential freie, Population einzusetzen, werden von den Ausgangszellen Zellen mit linienspezifischen Markern abgetrennt.

Die Zelltrennung mittels magnetischer Partikel erlaubt eine Trennung von Zellen in Suspension nach ihren Oberflächenantigenen. Dazu werden die Zellen entweder direkt oder über den Zwischenschritt eines primären Antikörpers mit paramagnetischen Microbeads gekoppelt. Diese aus Eisenoxid und Polysacchariden aufgebauten biodegradierbaren Kügelchen beeinträchtigen weder die Wachstumseigenschaften noch im folgenden durchzuführende Zelluntersuchungsmethoden. In die uniliniären Differenzierungssysteme wurde eine liniendepletierte CD34-Zellpopulation eingesetzt.

Mit einem vorgegebenen Wachstumsfaktorcocktail – wobei das steuernde Zytokin in hoher Konzentration zugefügt ist – wird eine uniliniäre Kultur ermöglicht. Hierdurch war es möglich in CellGro unter Zusatz von SCF (Stem Cell Factor, 10 ng/ml) Mastzellen zu generieren. Die Zugabe von TPO (Thrombopoietin, 100 ng/ml) bewirkte die Differenzierung zu Megakaryozyten. IL-5 (500 U/ml), GM-CSF (0,1 ng/ml) und IL-3 (1 U/ml) Zusätze generierten Eosinophile, während uniliniäre Granulozyten-Wachstumskulturen in serum-freiem CellGro-Medium mit IL-3 (1 U/ml), G-CSF (500 U/ml) und GM-CSF (0,1 ng/ml) durchgeführt wurden. Dem jeweiligem Cocktail wurde 40 µg/ml LDL (Low density lipoprotein) zugefügt (Ziegler *et al.*, 1998).

In Anlehnung an die Liniendepletionsmethode von Ziegler (Ziegler *et al.*, 1999) wurde eine Aufreinigung von CD34-Zellen aus peripherem Blut auf durchschnittlich 84,7 % durchgeführt. Die Lin⁻ CD34⁺ Zellen nach der linienspezifischen Depletion mit einem durchschnittlichen Gehalt von 95,7 % CD34⁺ Zellen wurden in die uniliniären Kulturen eingesetzt. Unter Zusatz von TPO wurden uniliniäre Kulturen zur Generierung von Megakaryozyten aus CD34⁺ Zellen durchgeführt. Die Clusterformation (Abbildung 26) war hierbei besonders auffällig. Bei uniliniären Versuchen ist aufgrund der hohen

Spendervariabilität eine erhebliche Schwankungsbreite bezüglich der erzeugten Zellzahl möglich.

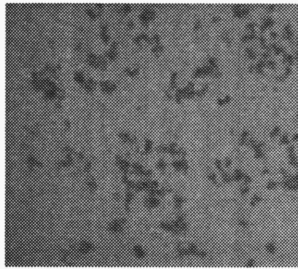


Abbildung 26

Bei der Generierung von Megakaryozyten aus $CD34^+$ Lin^- Zellen von peripherem nicht mobilisiertem Blut trat eine Clusterbildung der in Suspension entstandenen Zellen auf.

3.2.1 Eosinophile

In Anlehnung an die Liniendepletionsmethode von Ziegler (Ziegler *et al.*, 1999a) wurde eine Aufreinigung von $CD34$ -Zellen aus peripherem Blut durchgeführt. Diese Lin^-CD34^+ Zellen wurden 3 Wochen in serumfreiem CellGro-Medium unter Zusatz von IL-5 (500 U/ml), GM-CSF (0,1 ng/ml) und IL-3 (1 U/ml) sowie 40 μ g/ml LDL (Low Density Lipoprotein) zur Generierung von Eosinophilen kultiviert.

Eosinophile (Phänotyp: $CD25^+$, $CD49d^+$, $CD117^+$), terminal differenzierte Granulozyten, werden üblicherweise durch zelluläre und histologische Kriterien - Kernstruktur, intrazelluläre Granula und Lipidkörperchen - identifiziert (Tachimoto und Bochner, 2000), was sich aber bei diesen Kulturzellen als schwierig erwies, da aufgrund der langen Kulturdauer offensichtlich Strukturveränderungen auftraten. Die erzeugten Zellen wiesen Vakuolen auf und machten die morphologische Beurteilung anhand der Zytospins dieser Kulturzellen schwierig.

Zur durchflußzytometrischen Bestimmung der Zellen wurde $CD49d$, welches aber auch auf Basophilen und Mastzellen, jedoch nicht auf Neutrophilen detektierbar war, verwendet (Tachimoto und Bochner, 2000). Um also eine Bestätigung für die Produktion von Eosinophilen zu erlangen, wurden Zytospins mittels einer APAAP-Färbung zur Detektion eosinophilenspezifischer Eosinophile-Peroxidase untersucht (Bochner *et al.*, 1997).

Mittels eines Maus-anti-human Eosinophile Peroxidase-Antikörpers, der spezifisch ein 81 kDa großes Protein erkennt, welches nur auf Eosinophilen vorkommt (Skubitz *et al.*, 1988), konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei den generierten Zellen in der Eosinophilenkultur tatsächlich um eosinophile Zellen handelte. Obwohl die Zellen auf Zytospins nach Pappenheimfärbung nicht der üblichen Morphologie entsprachen, war es möglich, die generierten Zellen der Eosinophilenzelllinie zuzuordnen. Bei der durchflußzytometrischen Bestimmungen der Zellen waren viele Zellen CD45⁺, HLA-DR⁺ und wiesen eine Expression von CD49d auf.

Die Zahl der lebenden Zellen nach dieser uniliniären Differenzierungskultur war auf das 40-fache angestiegen, wobei Zusätze von IFN- γ (2000 U/ml), TGF- β (20 ng/ml) und MIP1- α (500 ng/ml) einen erheblichen Einfluß auf die Kulturzellen ausübten. Verglichen mit den Kontrollen ergab sich in diesen Kulturexperimenten zur uniliniären Differenzierung von Eosinophilen unter Zusatz von blockierenden Antikörpern gegen IFN- γ , MIP-1- α und TGF- β teils eine deutliche Veränderung der Proliferation. Inhibierend auf die Eosinophilenproduktion wirkte TGF- β (41,7 % weniger Zellen), während Zusätze von IFN- γ (36,7 % mehr) eine Steigerung der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen und MIP-1- α keine signifikanten Zellzahländerung (3,7 % mehr) bewirkte. Auffällig bei diesen Experimenten zur Untersuchung der uniliniären Differenzierung waren starke Schwankungen bei der Anzahl der generierten Zellen abhängig vom jeweiligen Versuch und Spender.

Zellzahl nach 3 Wochen Kultur bezogen auf Kontrolle in Prozent		Standardabweichung
CellGro + Wachstumscocktail + Isotyp IgG	100	
CellGro + Wachstumscocktail + TGF- β (20 ng/ml)	58,3	21,8
CellGro + Wachstumscocktail + anti- TGF- β (2 μ g/ml)	163	121
CellGro + Wachstumscocktail + anti-TGF- β (2 μ g/ml) + TGF- β (20 ng/ml)	154	105
CellGro + Wachstumscocktail + MIP-1 α (500 ng/ml)	103,7	30
CellGro + Wachstumscocktail + anti-MIP-1 α (100 ng/ml)	156	87,8
CellGro + Wachstumscocktail + MIP-1 α (500 ng/ml) + Anti-MIP-1 α (100ng/ml)	89,9	37
CellGro + Wachstumscocktail + IFN (2000 U/ml)	136,7	128
CellGro + Wachstumscocktail + anti-IFN- γ (10 μ g/ml)	158,1	84

Zellzahl nach 3 Wochen Kultur bezogen auf Kontrolle in Prozent		Standard-abweichung
CellGro + Wachstumscocktail + anti- IFN- γ (10 μ g/ml) + IFN- γ (2000 U/ml)	127,6	49,7

Uniliniäre Eosinophilen-Wachstumskultur von CD34⁺ Lin⁻ Zellen in CellGro-Medium mit 40 μ g/ml Low density protein (LDL), IL-3 (1 U/ml), IL-5 (500 U/ml), GM-CSF (0,1 ng/ml); wöchentliche Zugabe neuen Mediums; n=7

3.2.2 Mastzellen

In Anlehnung an die Liniendepletionsmethode von Ziegler (Ziegler *et al.*, 1999) wurde eine Aufreinigung von CD34-Zellen aus peripherem Blut durchgeführt. Diese Lin⁻ CD34⁺ Zellen wurden 3 Wochen in serumfreien CellGro-Medium unter Zusatz von SCF (Stem Cell Factor, 10 ng/ml) und 40 μ g/ml LDL (Low Density Lipoprotein) zur Generierung von Mastzellen kultiviert. Mastzellen sind CD117⁺, sowie CD25⁻ und CD11c⁻, wohingegen Basophile CD117⁺, CD25⁺ und CD11c⁺ sind (Tachimoto und Bochner, 2000).

Durch durchflußzytometrische Analyse (CD117) konnte die Generierung von Mastzellen nachgewiesen werden. CD117 ist auf Eosinophilen negativ und nur auf Mastzellen hoch exprimiert vorhanden (siehe 3.2.1.). Ausgehend von 1000 Zellen konnte durchschnittlich eine 32-fache Expansion der Zellen im Laufe der Kultur beobachtet werden, wobei aber die Schwankungsbreite erheblich war.

Auch bei der Generierung von Mastzellen in uniliniären Kulturen bewirkte der Zusatz von TGF- β eine starke Wachstumsinhibierung von 53 % im Vergleich zur Kontrolle. MIP-1- α -Zusatz führte zu einer Proliferationsreduktion von 26,6 %. Der Proliferationssteigerungseffekt von IFN- γ auf die Mastzellgenerierung war nur 7,1 % verglichen mit der Kontrolle. Die blockierenden Antikörper gegen IFN- γ , MIP-1- α und TGF- β bewirkten Zellzahlen, die im Bereich der Schwankungsbreite der Kontrolle lagen. Die Zugabe von neutralisierendem Antikörper für TGF- β hatte keine starke Proliferationssteigerung zur Folge, erzielte jedoch im Vergleich zur TGF- β -Zytokinzugabe eine Verdopplung der Zellzahl.

Zellzahl nach 3 Wochen Kultur bezogen auf Kontrolle in Prozent		Standard-abweichung
CellGro + Wachstumscocktail + Isotyp IgG	100	

Zellzahl nach 3 Wochen Kultur bezogen auf Kontrolle in Prozent		Standardabweichung
CellGro + Wachstumscocktail + TGF- β (20 ng/ml)	46,97	26,1
CellGro + Wachstumscocktail + anti-TGF- β (2 μ g/ml)	91,7	22,5
CellGro + Wachstumscocktail + anti-TGF- β (2 μ g/ml) + TGF- β (20 ng/ml))	91,4	49,8
CellGro + Wachstumscocktail + MIP-1 α (500 ng/ml)	73,4	24,9
CellGro + Wachstumscocktail + anti-MIP-1 α (100 ng/ml)	103,8	39,06
CellGro + Wachstumscocktail + MIP-1 α (500 ng/ml) + Anti-MIP-1 α (100 ng/ml)	94,05	37,82
CellGro + Wachstumscocktail + IFN- γ (2000 U/ml)	107,1	23,49
CellGro + Wachstumscocktail + anti- IFN- γ (10 μ g/ml)	90,6	37,3
CellGro + Wachstumscocktail + anti- IFN- γ (10 μ g/ml) + IFN- γ (2000 U/ml)	101	44,7

Uniliniäre Mastzell-Wachstumskultur von CD34⁺ Lin- Zellen in CellGro-Medium mit 40 μ g/ml LDL und SCF (Stem Cell Factor, 10 ng/ml); wöchentliche Zugabe neuen Mediums; n=7.

3.2.3 Neutrophile

In Anlehnung an die Liniendepletionsmethode von Ziegler (Ziegler *et al.*, 1999) wurde eine Aufreinigung von CD34-Zellen aus peripherem Blut durchgeführt. Diese Lin⁻ CD34⁺ Zellen wurden 3 Wochen in serumfreien CellGro-Medium mit IL-3 (1 U/ml), G-CSF (500 U/ml) und GM-CSF (0,1 ng/ml) sowie 40 μ g/ml LDL (Low Density Lipoprotein) zur Generierung von Neutrophilen kultiviert. Durch durchflußzytometrische Analyse (CD16) konnte die Generierung von Granulozyten nachgewiesen werden. CD16 ist auf Mastzellen und Eosinophilen negativ und nur auf Granulozyten stark vorhanden. Zusätzlich wurde noch CD15 als Positivmarker verwendet. Neutrophile sind CD16⁺, wodurch sich eine eindeutige durchflußzytometrische Abgrenzung zu Eosinophilen und Mastzellen machen läßt (siehe 3.2.1. und 3.2.2.). Nach 3 Wochen Kultur hat sich die ursprünglich eingesetzte Zahl von Zellen im Durchschnitt versiebenfacht (\pm Faktor 2).

Auch bei der Generierung von Granulozyten in uniliniären Kulturen aus CD34⁺ Zellen bewirkte der Zusatz von TGF- β eine starke Wachstumsinhibierung von 66,2 % im Vergleich zur Kontrolle. MIP-1- α -Zusatz führte zu keiner signifikanten Zellzahlveränderung (5 % Reduktion). Der Proliferationssteigerungseffekt von IFN- γ auf die Granulozytengenerierung war 23,6 % verglichen mit der Kontrolle. Die blockierenden

Antikörper gegen IFN- γ , MIP-1- α und TGF- β bewirkten Veränderungen der produzierten Zellzahlen, die im Bereich der Schwankungsbreite der Kontrolle lagen. Anti-IFN- γ -Antikörper bewirkte eine Halbierung der Zellexpansionskraft im Vergleich zur Kontrolle.

Zellzahl nach 3 Wochen Kultur bezogen auf Kontrolle in Prozent		Standardabweichung
CellGro + Wachstumscocktail + Isotyp IgG	100	
CellGro + Wachstumscocktail + TGF- β (20 ng/ml)	33,8	3,65
CellGro + Wachstumscocktail + anti-TGF- β (2 μ g/ml)	47,95	41,7
CellGro + Wachstumscocktail + anti-TGF- β (2 μ g/ml) + TGF- β (20 ng/ml)	85,6	9,7
CellGro + Wachstumscocktail + MIP-1 α (500 ng/ml)	94,95	23,95
CellGro + Wachstumscocktail + anti-MIP-1 α (100 ng/ml)	87	20,65
CellGro + Wachstumscocktail + MIP-1 α (500 ng/ml) + Anti-MIP-1 α (100 ng/ml)	127,3	4,3
CellGro + Wachstumscocktail + IFN- γ (2000 U/ml)	129,6	31,36
CellGro + Wachstumscocktail + anti- IFN- γ (10 μ g/ml)	49,71	5,78
CellGro + Wachstumscocktail + anti- IFN- γ (10 μ g/ml) + IFN- γ (2000 U/ml)	123,65	21,85

Uniliniäre Granulozyten-Wachstumskultur von CD34⁺ Lin⁻ Zellen in serum-freien CellGro-Medium mit 40 μ g/ml Low density protein (LDL), IL-3 (1 U/ml), G-CSF (500 U/ml) und GM-CSF (0,1 ng/ml); wöchentliche Zugabe neuen Mediums; n=2.

D Diskussion

Das Blut besteht aus Zellen verschiedener Zelllinien mit unterschiedlichen Funktionen. Viele dieser Zellen haben eine limitierte Lebenszeit und sind unfähig, sich zu teilen. Daher müssen sie während des ganzen Lebens ununterbrochen aus Stammzellen ersetzt werden. Aus den pluripotenten Stammzellen entwickeln sich multi- und unipotente Vorläuferzellen, die nach Stimulation proliferieren und in die verschiedenen Zellen differenzieren.

Die Differenzierung hin zu hochspezialisierten Effektorzellen ohne Proliferationspotential ist ein Schwerpunkt der Forschung im Bereich der Hämatopoese (Socolovsky *et al.*, 1998).

Die Untersuchung differentiell exprimierter Gene und Antigenanalysen können Aufschluß über die verschiedenen Subpopulationen hämatopoetischer Vorläuferzellen geben. Neben der Aufklärung der zellulären Ontogenese ist vor allem die Anwendung von Zellektion und -proliferation für klinische Zwecke von großer Bedeutung.

Die Durchflußzytometrie hat sich aufgrund der Möglichkeit einer simultanen Analyse verschiedener zellulärer Parameter, wie der Expression von Oberflächenproteinen und zytoplasmatischen Antigenen, der Zellzyklusanalyse, sowie der funktionellen Typisierung anhand von zellulären Enzymen, in vielen Fällen zur Charakterisierung von Zellen etabliert.

1 CD34-Subpopulationen

Das CD34-Antigen stellt den vorrangigen Detektionsparameter für die durchflußzytometrische Analyse hämatopoetischer Vorläuferzellen dar. Die Expression des Glykoproteins CD34 auf hämatopoetischen Zellen nimmt im Verlauf der Zelldifferenzierung kontinuierlich ab und geht schließlich ganz verloren (Civin *et al.*, 1984). Unterschiede bezüglich der einzelnen Zelllinien treten hierbei nicht auf (Sutherland *et al.*, 1989). Die gleichzeitige durchflußzytometrische Messung von bis zu 6 Parametern (FSC, SSC und 4 Fluoreszenzen) ermöglicht eine bislang durch andere Methoden nicht

mögliche Charakterisierung von Subpopulationen der CD34⁺ Zellen, indem über die Diskriminierung des CD34-Antigens verschiedene zusätzliche Oberflächenmoleküle bestimmt werden können. Diese Form der Datenaquisition ermöglicht es, eine prozentual kleine Subpopulation isoliert aufzunehmen und zu analysieren.

Der Anteil CD34⁺ Zellen im Knochenmark liegt bei 0,5 % bis 3 % (McAdams *et al.*, 1996; Sutherland DR *et al.*, 1994). Zahlreiche klinische Studien belegen, daß diese Zellen eine Langzeitrekstitution von Knochenmark nach einer intensiven Chemotherapie ermöglichen und somit Stammzellen enthalten müssen. Auch im Nabelschnurblut gesunder Neugeborener sind Vorläufer- und Stammzellen in ähnlicher Konzentration wie im Knochenmark enthalten. (Broxmeyer *et al.*, 1999). Durch Transplantation von Nabelschnurblut nach myeloablativer Chemotherapie konnte auch für Nabelschnurblutstammzellen ein Potential zur Langzeitrekstitution gezeigt werden. Da CD34⁺ Zellen in unstimulierten peripheren Blut nur mit einer Frequenz von 0,01 bis 0,2 % nachweisbar sind, setzt die Gewinnung von Blutstammzellen eine Behandlung mit Wachstumsfaktoren (bei autologen Transplantationen kombiniert mit Chemotherapie) voraus (McAdams *et al.*, 1996; Sutherland DR *et al.*, 1994). Denn erst nach einer Wachstumfaktorthherapie (z. B. G-CSF) werden diese Stammzellen in ausreichender Frequenz in das periphere Blut ausgeschwemmt. Der zugrunde liegende Mechanismus für die Ausschwemmung von Stammzellen ist bisher ungeklärt. Diese peripheren Blutstammzellen werden mittels Leukapherese gesammelt und angereichert. Da mobilisierte Stammzellen des peripheren Blutes heute die am häufigsten verwendeten Zellen für autologe, aber auch zunehmend allogene Transplantationen sind, hat dieser Mobilisationsprozeß große klinische Bedeutung. Die Ausschwemmung von Stammzellen aus dem Knochenmark erfolgt jedoch nur über wenige Tage nach Faktorthherapie in der Rekonstitutionsphase des Knochenmarks, so daß der Zeitpunkt der Leukapherese exakt bestimmt werden muß. Die Anzahl der CD34⁺ Zellen wird meist durchflußzytometrisch bestimmt. Die Mobilisierungsfähigkeit von Stammzellen ist aber sehr variabel und vermutlich von vielen Faktoren, u. a. der Subpopulationszusammensetzung und Art der Vorbehandlung des Patienten abhängig. Der Anteil der Stammzellen im peripheren Blut nimmt rasch wieder ab und in der Regel ist nach einer Woche ein „Normalzustand im peripheren Blut“ erreicht. Diese Transplantation mobilisierter Stammzellen hat gegenüber der konventionellen Knochenmarkstransplantation einige wesentliche

Vorteile. Insbesondere die Rekonstitution nach der Knochenmarkstransplantation dauert etwas länger. Aufgrund dieser längeren neutropenischen Phase besteht eine höhere Infektionsgefahr für den Patienten. Eine Stammzelltransplantation ist insbesondere durch die rasche Rekonstitution der Granulo- und Thrombopoese ausgezeichnet. Aufgrund der klinischen Bedeutung der Mobilisation von Stammzellen und der häufigen Verwendung von mobilisierten Stammzellen zur Transplantation versuchten wir, CD34⁺ Vorläufer- und Stammzellen aus dem peripheren Blut ohne oder nach Mobilisation im Vergleich mit Knochenmark und Nabelschnurblut zu charakterisieren. Die Infusion des kleineren Volumens bei Stammzelltransplantationen hat weniger akute Nebenwirkungen und auch die einfachere Gewinnung der Stammzellen mittels Leukapherese ist vorteilhaft. Aus diesen Gründen sind Konzepte zur Optimierung des therapeutischen Vorgehens, die sich aus einer genauen Kenntnis der Zusammensetzung der CD34-Population ergeben, eine große Hoffnung.

In der Literatur werden CD34-exprimierende Zellen, die CD38⁻ sind, als eine sehr frühe und wenig determinierte Fraktion der Vorläuferzellen beschrieben (Eaves *et al.*, 1991; Teofill *et al.*, 1994). Durch Verwendung weiterer Antikörper konnte eine genauere Charakterisierung der CD34⁺ Zellen erreicht werden (Sutherland *et al.*, 1994). Diese Subpopulationsanalyse versucht, CD34⁺ Zellen entsprechend ihrer zellulären Entwicklungsreihe und ihres Reifungsstadiums zu differenzieren.

Die absolute Zahl CD34⁺ hämatopoetischer Zellen pro ml besitzt einen prädikativen Wert für das Rekonstitutionspotential des Aphereseprodukts (Haase *et al.*, 1994). Eine Vorhersage des Thrombozyten- und Neutrophilen-Rekonstitutionspotentials konnte anhand der Zahl CD34⁺ CD41a⁺ bzw. CD34⁺ CD33⁺ hämatopoetischer Zellen gezeigt werden (Dercksen *et al.*, 1995). Dagegen hat die Identifizierung und Quantifizierung unreifer Fraktionen im Blut oder Aphereseprodukt bisher noch keine klinisch relevante Bedeutung hinsichtlich des Kurz- und Langzeit-Engraftments (Bender *et al.*, 1994).

Eine genauere Kenntnis der CD34-Subpopulationen und deren quantitativer Verteilung in den einzelnen Stammzellquellen ist deshalb für therapeutische Anwendungen von großem Nutzen.

Wir untersuchten daher vergleichend die Zusammensetzung der CD34⁺ Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut, Knochenmark und Nabelschnurblut bezüglich immunphänoty-

pisch definierter Subpopulationen. Die Bedeutung dieser immunphänotypisch charakterisierten Subpopulationen wird bei Analysen zur Rekonstitution nach Knochenmarkstransplantation deutlich.

Analysiert werden sollte der Gehalt an primitiven Vorläufer- und Stammzellen ($CD34^+ CD38^-$), myelo-monozytären Vorläuferzellen ($CD34^+ CD64^+$), lymphatischen Vorläufern ($CD34^+ CD19^+ / CD34^+ CD10^+$) sowie einer Population von differenzierten erythrozytären Vorläufern ($CD34^+ CD32^+$). Verwendet wurde frisch gewonnenes und heparinisiertes Nabelschnurblut von gesunden Neugeborenen, Knochenmark gesunder Spender, nicht mobilisiertes peripheres Blut gesunder Spender, welches durch Leukapherese gewonnen und mittels Gegenstromelutriation weiter aufgereinigt wurde, sowie durch Chemotherapie und G-CSF mobilisiertes peripheres Blut von Patienten mit soliden Tumoren.

Oberflächenmarker wie $CD64$ identifizieren Populationen, die für uniliniäre oder bipotente Vorläuferzellen einer festgelegten Differenzierungsrichtung angereichert sind (Olweus *et al.*, 1996).

Bei myeloischen Vorläuferzellen $CD34^+ CD64^+$ war der Gehalt im Knochenmark (8,49 %) gegenüber mobilisiertem peripheren Blut (1,93 %) erhöht. Diese Vorläuferzellen hatten mit 6,4 % bei gesunden Spenderproben und Nabelschnurblut (2,79 %) in den beiden anderen Stammzellquellen Anteile die zwischen Knochenmark und mobilisiertem peripheren Blut lagen.

Bei lymphatischen Vorläuferzellen $CD34^+ CD10^+$ ist der höchste Prozentwert in Knochenmark detektierbar (18,45 %), während unmobilisiertes peripheres Blut mit nur 2,55 % den niedrigsten Gehalt aufweist. Verglichen mit mobilisiertem peripheren Blut war bei lymphatischen Vorläuferzellen in gesunden Spendern nur ein Viertel des Gehalts vorhanden. Im Nabelschnurblut war die $CD34$ -Subpopulation mit Koexpression von $CD10$ und $CD19$ am höchsten, was auf einen auffallend hohen Bestand von Vorläuferzellen mit lymphatischer Differenzierungsrichtung hinweist. Da über die lymphatischen Vorläuferzellen relativ wenig bekannt ist, eignet sich auch Nabelschnurblut, obwohl es im Vergleich zu den anderen Stammzellquellen nur stark limitiert in größeren Mengen (maximal 150 ml pro Geburt) erhältlich ist, zur selektiven Aufreinigung und deren Untersuchung. Fritsch *et al.* detektierten 30,1 % lymphatische Vorläu-

ferzellen innerhalb der CD34-Population im Knochenmark, wobei aber ein Streubereich zwischen 0 und 84 % angegeben wurde und sowohl die Werte in Nabelschnurblut als auch im peripherem Blut mit den Werten dieser Arbeit korrelierten (Fritsch *et al.*, 1996). Cho *et al.* bestimmten ebenfalls den höchsten Wert bei Knochenmark (34, 9 %) im Vergleich zu 5,6 % bei mobilisiertem peripherem Blut (5,6 %) und 4,7 % bei Nabelschnurblut (Cho *et al.*, 1999). Die italienische Gruppe um D'Arena fand ebenso einen höheren Gehalt an CD34⁺ CD19⁺ und CD34⁺ CD10⁺ Zellen im Knochenmark verglichen mit mobilisiertem Blut, wobei die Prozentdifferenzen ebenfalls mit unseren Werten korrelieren. Gerade diese Unterschiede zwischen CD34-Zellpopulationen bei Knochenmark und mobilisiertem Blut helfen die Unterschiede bei den Repopulationskinetiken nach Transplantation zu erklären (Chang *et al.*, 1997).

Das CD38-Antigen wird verwendet, um hoch angereichert primitive Vorläuferzellen zu isolieren. Daher ist der Gehalt in der jeweiligen Stammzellquelle von besonderem Interesse. Bei den primitiven CD34⁺ CD38⁻ Vorläuferzellen war der Gehalt beim mobilisierten peripheren Blut mit 0,99 % erwartungsgemäß am höchsten, wobei aber auch Knochenmark (0,77 %) und Nabelschnurblut (0,9 %) einen ca. vierfachen Wert im Vergleich zu peripherem Blut gesunder Spender hatten. Die Gruppe von Cho konnte ebenso keine signifikant unterschiedlichen Werte für CD34⁺ CD38⁻ Zellen messen, wobei aber deren Prozentwerte erheblich über den in dieser Arbeit gemessenen lagen (Knochenmark: 4,4 % \pm 2,8 %; mobilisiertes peripheres Blut: 5,3 % \pm 2,1 %; Nabelschnurblut: 5,9 % \pm 3,9 %) (Cho *et al.*, 1999), was wahrscheinlich an einem großzügigen Gating liegt.

De Bryn *et al.* bestimmten die CD34⁺ CD38⁻ Anteile in Nabelschnurblut, Knochenmark und mobilisiertem peripheren Blut und versuchten Korrelationen der Zellzykluskinetik dieser Subpopulation mit deren Sensitivität für SCF und IL-3 zu zeigen. In Bezug auf Zelladhäsionsmoleküle konnten signifikante Unterschiede bei der CD34-Population in Nabelschnurblut, Knochenmark und fötaler Leber nachgewiesen werden (Roy und Vervaille, 1999). Die Mikroumgebung sowie die jeweilige Rezeptorexpression beeinflussen die relative Verteilung. Tao *et al.* konnten einen höheren Gehalt an CD34⁺ CD38⁻ Zellen in Nabelschnurblut im Vergleich zu Knochenmark nachweisen. CD34-Zellen aus Nabelschnurblut expandierten nach zwei Wochen serum-freier Kultur auch stärker an

kernhaltigen und megakaryozytären Zellen wie die Knochenmarks-CD34-Zellen (Tao *et al.*, 1999). So befinden sich im unstimulierten Zustand weniger unreife CD34⁺ CD38⁻ Zellen aus Nabelschnurblut ($2 \pm 0,4 \%$) und mobilisiertem peripherem Blut ($0,9 \pm 0,3 \%$) im Vergleich zur entsprechenden Knochenmarkspopulation in der S+G2M-Phase des Zellzyklus. Nach 48 Stunden SCF/IL-3-Stimulation konnte ein signifikanter Anstieg der S+G2M-Phase-Gehalts bei Nabelschnurblut ($14,1 \pm 5,5 \%$ und peripherem Blut ($19,2 \pm 2,2 \%$) beobachtet werden. Die Expression von CD123 (IL-3-Rezeptor) und CD117 (SCF-Rezeptor) auf den drei untersuchten Stammzellquellen korreliert weder mit der Sensitivität für SCF noch mit der proliferativen Kapazität (De Bruyn *et al.*, 2000). Vermutlich sind die Eigenschaften gleicher Subpopulationen aus verschiedenen Quellen (Nabelschnurblut, Knochenmark und mobilisiertes peripheres Blut) stets unterschiedlich. In peripherem Blut gesunder, meist männlicher, Spender konnte ein erhöhter Gehalt an CD34⁺ CD32⁺ (Fc- γ -Rezeptor II) Vorläuferzellen, im Vergleich zu den anderen Stammzellquellen, festgestellt werden ($37,57 \pm 15,64 \%$). Die Standardabweichung war relativ hoch, so daß der Unterschied nur im Vergleich zu mobilisiertem peripheren Blut signifikant war.

Die Expression von Fc- γ RII (CD32) auf hämatopoetischen Zellen klassifiziert eine Population von CD34⁺ Zellen, deren Differenzierungsrichtung hauptsächlich ein erythroides Potential hat, obwohl die Expression von Maus (low affinity) Fc- γ RII/III spezifisch für ganulo-monozytäre Vorläuferzellen ist. Fc- γ -Rezeptoren binden an IgG-Antikörper und besitzen eine wichtige Funktion bei der Immunregulation durch Verknüpfung der humoralen und zellulären Immunantwort (Olweus *et al.*, 1995).

Eine Untersuchung CD32⁺ CD34⁺ Zellen und deren Eigenschaften eröffnet eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Expressionslevel auf CD34⁺ Vorläuferzellen (Kondo *et al.*, 2000). Vermutlich stellen CD32⁺ CD34⁺ Zellen wegen des hohen Gehaltes in „steady state“ peripherem Blut ein deutliches Charakteristikum der Vorläuferzellen im Blut gesunder Menschen im Vergleich zu anderen Stammzellquellen dar.

Weekx *et al.* detektierten ebenso einen niedrigeren Gehalt an CD34⁺ CD38⁻ Zellen in Knochenmark im Vergleich zu fötaler Leber und Nabelschnurblut. Weekx folgerte, daß aufgrund veränderter Subpopulationszusammensetzungen insbesondere Expansions- als auch Transplantationsmethodiken entscheidend beeinflußt werden (Weekx *et al.*, 1998).

Es läßt sich also vermuten, daß auch innerhalb der jeweiligen Stammzellquellen Subpopulationsunterschiede - abgesehen von den bereits bekannten wie Gehalt an CD34⁺ CD38⁻ Zellen - ein wichtiges Charakteristikum darstellen. Wahrscheinlich hängt das Repopulationspotential eines „Stammzellpräparats zur Transplantation“ auch vom Gehalt mehrerer bisher unberücksichtigter Subpopulationen ab.

Neueste klinische Studien zeigen, daß die CD34-Subpopulationsanalyse von hoher klinischer Relevanz ist und Korrelationen zwischen Subpopulationen (CD34⁺ FLT3R⁺, CD34⁺ G-CSFR⁺) und Rekonstitutionsdauer der Hämatopoese nach Transplantation auftreten (Baech und Johnsen, 2000)

Man erkennt also deutlich eine unterschiedliche Zusammensetzung und signifikante Subpopulationsunterschiede in den einzelnen Stammzellquellen.

CD34-Zellen aus Knochenmark, Nabelschnurblut, peripherem Blut mobilisierter und nicht mobilisierter Spender sind nicht gleichartig bezüglich ihrer Vorläuferzellsubgruppen und müssen daher gesondert betrachtet werden.

2 CD34⁺ Einzelzellen

Die Charakterisierung von Stammzellen wird durch die geringe Zahl in den verfügbaren Geweben (Knochenmark, peripheres Blut und Nabelschnurblut) stark erschwert. Darüber hinaus ist der Phänotyp einer Stammzelle unbekannt und die Isolation einer homogenen Stammzellpopulation bis dato unmöglich.

Um diese Problematiken zu umgehen, wurden Zellen mittels einer neuartigen PCR-Technik auf Einzelzellebene untersucht.

Mit der PCR-Technik steht ein molekularbiologisches Verfahren zur Verfügung, mit dessen Hilfe man über die nahezu unbegrenzte Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnitts sehr geringe Mengen einer bestimmten Nukleinsäure hochspezifisch nachweisen kann. Grundlage dieses thermostabilen Verfahrens ist die *in vitro* Replikation von Nukleinsäure. Dabei wird ein diskretes Fragment der zu vermehrenden Nukleinsäure über die sequenzspezifische Hybridisierung und Elongation von zwei synthetisch hergestellten Oligonucleotiden (Primern) in exponentieller Weise amplifiziert. Das Grundprinzip dieser dreistufigen thermostabilen Reaktion basiert auf der

wiederholten Denaturierung doppelsträngiger DNA zu Einzelsträngen, der spezifischen Hybridisierung der Primermoleküle an komplementäre Sequenzbereiche der einzelsträngigen Template-Nukleinsäure und einer templatespezifischen Verlängerung dieser Primer mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase. Hierfür waren nur geringe Mengen an Untersuchungsmaterial nötig. Die PCR-Ergebnisse können nicht durch verunreinigende Zellen verfälscht werden und auf einer einzelnen Zelle konnten mehrere Rezeptoren nachgewiesen werden. Aufgrund funktioneller Unterschiede der Vorläuferzellen aus Knochenmark, peripherem Blut oder Nabelschnurblut wurden zunächst nur periphere Blutzellen auf mRNA-Ebene charakterisiert. In Vorarbeiten erfolgte mit einer anderen Methode bereits die Untersuchung der Rezeptorexpression für M-CSF, SCF, FL, IL-11 und LIF auf einer primitiven Vorläuferzellpopulation (Roberts *et al.*, 1996). Hierbei wurden SCF- und FL-Rezeptoren auf fast allen Zellen, für G-CSF und GM-CSF, jedoch nur auf 20 % der Zellen exprimiert. Nicht detektiert wurden Rezeptoren für IL-11 und LIF. Diese Untersuchungen wurden mit radioaktiv markierten Wachstumsfaktoren durchgeführt, wobei viele Zellen benötigt wurden. Eine Erstellung eines Expressionsmusters des Genrepertoires einer einzelnen Zelle war nicht möglich, da die Untersuchungen nicht auf Einzelzelebene erfolgten.

Auch im Tiermodell waren vorher schon Daten auf Proteinebene publiziert, welche die Rezeptoren für SCF, IL-3 und G-CSF ermittelten (De-Jong *et al.*, 1995; Wagemaker *et al.*, 1995; Ziegler *et al.*, 1998).

Basierend auf der Anwendung von Oligo (dT) gekoppelten magnetischen Partikel zur Isolierung polyadenylierter RNA, sowie der cDNA-Synthese direkt an den magnetischen Partikeln, ist es möglich, sogenannte „solid-phase“ libraries aus Einzelzellen herzustellen. Die kovalente Bindung der cDNA an die magnetischen Partikel erlaubt es, nach jeder Amplifikation die cDNA mittels Magneten wieder zurückzugewinnen. Es ist daher zur Untersuchung mehrerer Moleküle in einer Zelle nicht nötig, die synthetisierte cDNA aufzuteilen, sondern zur Analyse jedes Moleküls kann die gesamte isolierte cDNA verwendet werden. Als weiterer Vorteil ist die Synthese langer cDNA-Fragmente zu nennen, die es erlaubt, PCR-Reaktionen jeweils im translatierten Abschnitt des jeweiligen mRNA-Moleküls durchzuführen. Hierbei ist auch das Überwinden von großen Bereichen über 2500 kb (c-kit) möglich (Zaiss und Boyd, 1997). Dies ist von Bedeutung

für die Analyse neuer mittels PCR amplifizierter Genfragmente. Die PCR erlaubt die Amplifikation von DNA-Fragmenten in sehr kurzer Zeit.

Die eingesetzte RT-PCR verwendet RNA als Ausgangsmaterial. Hier wird zunächst mit dem Enzym Reverse Transkriptase eine DNA-Kopie (cDNA) hergestellt, die als Ausgangsmatrize für die Amplifikation dient. Diese Analyse der Genexpression mittels PCR ist wesentlich sensitiver als RNA-Blotting-Techniken. In der klassischen Diagnostik wurde hierfür die Northern-Blot-Analyse eingesetzt. Das spezifische Transkript wird hierbei über Hybridisierung mit geeigneten DNA-Sonden nachgewiesen.

Bei Verwendung von radioaktiv markierten Sonden kann das zu analysierende Transkript nach Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Da die Empfindlichkeit des radioaktiven Nachweises im pg-Bereich einzuordnen ist, erfordert eine erfolgreiche Northern-Blot-Analyse den Einsatz von 10 µg mRNA, wofür etwa 10^8 Zellen oder 5 - 10 mg frisches Gewebe nötig sind.

Die geringe Verfügbarkeit der humanen Vorläuferzellen macht die ohnehin schneller durchzuführende PCR zu dem geeigneten Analyseverfahren für die Genexpression. Häufig treten bei einer PCR-Reaktion Probleme durch die Kontamination mit Fremd-DNA auf. Kontrollreaktionen werden daher immer mitgeführt.

Prinzipiell wurden in unseren Experimenten eine „Blind-PCR“ mit allen Materialien außer dem Substrat durchgeführt. Damit konnte sofort eine Amplifikation durch eine Kontamination in einem verwendeten Material entdeckt bzw. ausgeschlossen werden.

Bei der Auswahl der Primer wurde stets darauf geachtet, daß ein typischer Primer zwischen 18 und 25 Basenpaare lang ist und einen 50 %-igen G/C-Gehalt mit zufälliger Basenverteilung aufweist. Hierbei sind aber mehr als zwei G und C hintereinander ungünstig, da sonst eine unspezifische Hybridisierung an G/C-reichen Sequenzen gefördert wird. Die in einer Reaktion verwendeten Primer weisen im Idealfall auch den gleichen Schmelzpunkt auf.

Die exponentielle Amplifikation eines spezifischen Fragments ist allerdings nicht beliebig oft wiederholbar, nach 25 Zyklen ist aufgrund einer sinkenden Effizienz nur noch eine lineare Zunahme zu beobachten. Dieses Plateau in der Produktkonzentration tritt auf, weil am Anfang der PCR eine Primerkonzentration von etwa 10^6 -fachem

Überschuß vorliegt. Die Hybridisierung der Primer mit der cDNA-Matrize kann daher innerhalb einer Minute nahezu vollständig erfolgen, eine Reassoziations der komplementären DNA-Moleküle tritt damit praktisch nicht auf. Mit steigender Produktmenge nimmt aber die Primerkonzentration in den späteren Zyklen so weit ab, daß eine Renaturierung der amplifizierten Matrizen möglich wird und diese damit nicht mehr als Polymerase-Substrat zur Verfügung stehen. Die Effizienz ist also in den ersten Zyklen, bei niedriger Matrizenkonzentration am höchsten.

Konformation, Konzentration und Präparation der DNA spielen bei der PCR eine wichtige Rolle. Aber auch die Primerkonzentrationen sind wichtig. Zur Optimierung einer bestimmten Reaktion sollten Konzentrationen zwischen 0,02 und 0,5 μM gewählt werden. Das Optimum liegt für die etablierte Einzelzell-PCR im Bereich bis 0,1 μM . Die Primerkonzentration muß hoch genug sein, damit genügend Oligonucleotide für das Annealing in den aufeinanderfolgenden Zyklen zur Verfügung stehen. Zu hohe Primerkonzentrationen sind aber äußerst kritisch, da sie auch bei nur geringer Komplementarität der Nucleotidfolge oft zur Selbsthybridisierung der Primer führen. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Primer-Dimer-Artefakten, die als Enzymsubstrat dienen und mit dem gewünschten Produkt konkurrieren können. Außerdem können zu hohe Primerkonzentrationen Fehlhybridisierungen und infolge dessen Nebenproduktbildungen bewirken.

Bei der eingesetzten Einzelzell-PCR waren nur sehr wenige Matrizenmoleküle vorhanden, daher wurde die Zyklenzahl von 30 verwendet. Um die Problematik hoher Zyklenzahlen zu umgehen, wurde der nested-PCR-Ansatz verwendet. Die nested-PCR erhöht darüber hinaus die Spezifität der PCR, da 4 genspezifische Primer verwendet werden. Bei 300.000 Molekülen im Ansatz sollten etwa 25 Zyklen durchlaufen werden.

Bei einer symmetrischen PCR-Reaktion liegen die beiden PCR-Primer-Moleküle in derselben Molarität in der Lösung vor (z. B. 25 μM). Das Ergebnis solcher Reaktionen sind doppelsträngige DNA-Moleküle. Es lassen sich unter Verwendung gut ausgewählter entgegengesetzt orientierter genspezifischer Primer Fragmente definierter Länge und Sequenz anreichern.

Hervorzuheben ist, daß durch diese Einzelzell-PCR 4 - 5 Faktoren und /oder Rezeptoren gleichzeitig auf einer einzigen Zelle nachweisbar sind. Durch diesen Assay ist es

möglich einzelne Zellen bezüglich ihrer "Eigenschaften" qualitativ zu diskutieren. Vor allem bei der sehr heterogenen Vorläuferzellpopulation stellt diese Einzelzell-PCR-Methode aufgrund ihres geringen Bedarfs an Zellen, Homogenität des PCR-Ausgangsmaterials (ohne Verfälschungen) und des Mangels an geeigneten *in vitro* Assays eine ausgezeichnete Möglichkeit dar, hämatopoetische Vorläuferzellen und deren Klonalität zu untersuchen.

Obwohl der Rezeptor- bzw. Faktornachweis auf Einzelzellen von Zelllinien (z. B. CCRI) gelang, war er auf gesorteten CD34-Zellen negativ. Entweder der Rezeptor war nicht vorhanden oder er war auf diesen CD34-Zellen unter der Nachweisgrenze. Da die Genexpression von Zellen in Wellen verläuft (Hume *et al.*, 2000), erklärt dieses Phänomen die Tatsache, daß manche Rezeptoren nicht immer nachweisbar sind. Auf KG-1-Zelllinienzellen konnten immer in über 90 % β -Actin und CD34 nachgewiesen werden.

Ziel war es, auf mRNA-Ebene zu prüfen, welche Zelle welchen Rezeptor und/oder Zytokin exprimiert bzw. sezerniert. Es sollte sich als ein Muster ergeben, welche Zelle aus welcher Subpopulation was - Zytokin/Zytokinrezeptor - gleichzeitig exprimiert und was nicht. Von besonderem Interesse waren die Rezeptoren für IFN- γ , TGF- β und MIP-1- α , da deren Expression möglicherweise von entscheidender Bedeutung für die *in vitro* Kultivierung primitiver humaner Vorläuferzellen ist. Durch eine Zelllinienkontrolle, bei der ein Nachweis bis zu einer $\frac{1}{2}$ Zelle möglich war, war die Sensitivität für die Durchführung dieser PCR-Methode auf Einzelzellen gegeben (Verwendung als Positivkontrolle). Von zwölf untersuchten CD34⁺ Zellen waren acht (75 %) Zellen für β -Actin und CD34 positiv. Drei der β -Actin-positiven Zellen exprimierten CCRI auf RNA-Ebene. Eine Expression von CCRV wurde auf drei weiteren der β -Actin-positiven Zellen nachgewiesen. Vier der β -Actin-positiven Zellen waren positiv für IFN- γ R. Eine der isolierten CD34-Einzelzellen exprimierte auf RNA-Ebene TGF- β RI.

Die Expression von CCRI und CCRV konnte damit auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Mittels Durchflußzytometrie war die Expression von CCRI auf 2 % der CD34⁺ Zellen gezeigt worden. Dies korreliert gut mit dem Prozentsatz der positiven Zellen in unserem Ansatz. Auch konnte keine gemeinsame Expression von CCR I und CCRV in einer Zelle gezeigt werden.

Von 18 sortierten CD34⁺ CD10⁺ lymphatischen Vorläuferzellen konnte in 15 β -Actin und CD34 nachgewiesen werden. Die Expression von TGF- β 1, TGF- β RI, TGF- β RII, TGF- β RIII, MIP-1- α , CCRI, CCRIV, CCRV, IFN- γ und IFN- γ R konnte in keiner CD34-Zelle gezeigt werden, obwohl der Nachweis auf Zelllinien mit ausreichender Sensitivität - mit bis zu 1/2 Zelle - möglich war. Entweder der Rezeptor war nicht vorhanden oder er war auf diesen CD34-Zellen unter der Nachweisgrenze.

Da die Genexpression von Zellen in Wellen verläuft (Hume *et al.*, 2000), könnte es sein, daß daher ein Rezeptornachweis auf diesen lymphatischen Vorläuferzellen nicht möglich war. Der Nachweis der verschiedenen Rezeptoren in Einzelzellen von Zelllinien war aber möglich. In diesen rezeptorpositiven Zelllinien war eine durchflußzytometrische 4-Farben-Analyse für die angegebenen Rezeptoren zwar durchführbar, konnte aber auf CD34-Zellen aufgrund eines zu hohen Backgrounds nicht reproduzierbar durchgeführt werden.

Für Untersuchungen zur Expression von Rezeptoren für TGF- β standen zu der Zeit keine durchflußzytometrisch geeigneten monoklonalen anti-human Antikörper zur Verfügung.

Die RNA-Expression CD34⁺ Vorläuferzellen spiegelt die Heterogenität der CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellpopulation wieder, wobei durch die genauere Untersuchung des Genrepertoires eine eingehendere Definition, insbesondere auch einzelner weiterer Differenzierungsstufen innerhalb einer über Oberflächenantigene charakterisierten Subpopulation, möglich ist.

Mittels PCR-Assays wäre die Beurteilung eines Transplantats, bzw. die Einschätzung des Therapieerfolgs anstelle von *in vitro* Assays, denkbar.

3 CD84-Expression auf humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen

Der im Jahr 1985 klonierte monoklonale Antikörper Max.3 bindet und erkennt spezifisch CD84 (Krause SW *et al.*, 2000). Max.3 weist die Expression von CD84 auf Makrophagen und Megakaryozyten und schwach auf Monozyten nach (Andreesen *et al.*, 1986). Im Laufe der *in vitro* Differenzierung von Monozyten wird CD84 hochreguliert

(Andreesen *et al.*, 1988). Drei weitere Antikörper (2G7, 152-1D5, 153-4D7) wurden später von anderen Arbeitsgruppen kloniert (5th International Workshop on Leucocyte Typing). Unter Verwendung dieser monoklonalen Antikörper wurde die CD84-Expression auf B-Lymphozyten, T-Zellsubpopulationen und Thymozyten nachgewiesen.

Die T-Lymphozyten mit der erhöhten CD84-Expression waren überwiegend Memory-T-Zellen (CD4⁺, CD45RO⁺, CD45RA⁻, CD44⁺⁺) (de la Fuente *et al.*, 1997).

Über die Expression von CD84 auf frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen war wenig bekannt. Im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit konnte erstmals die CD84-Expression auf CD34⁺ Zellen untersucht werden.

Zunächst zeigte sich ein unterschiedlicher Prozentgehalt von CD34⁺ Zellen, die CD84 exprimieren, abhängig von der Quelle der Vorläuferzellen. Die CD84-Expression auf Blastenzellen von Myeloischen Leukämien und akuten Lymphatischen Leukämien war bereits bekannt (Engel *et al.*, 1995). Die Mediane der relativen Fluoreszenzintensitäten des CD84-Oberflächenantigens von B- und T-Lymphozyten sind gleich. Mobilisierte Vorläuferzellen des Blutes exprimierten deutlich seltener CD84 als nicht mobilisierte CD34⁺ Zellen des Blutes.

Mittels FACS ist es auch möglich, die genaue Anzahl der Rezeptoren zu ermitteln. Bei quantitativen Analysen ist jedoch im Allgemeinen eine Umrechnung der Fluoreszenzintensität in die Anzahl der gebundenen Antikörper pro Zellen nicht möglich, da die Fluoreszenzintensität von einer Vielzahl gerätemanenter Einstellungen abhängig ist. Grundsätzlich ist daher die Verwendung von Fluoreszenzintensitäten für quantitative Aussagen nur nach Standardisierung des jeweiligen Cytometers mit fluoreszierenden kalibrierten Beads möglich.

Bei dem verwendeten Durchflußzytometer (FACScalibur) liegt die untere Nachweisgrenze bei etwa 500 Rezeptoren pro Zelle. Da diese CD84-Messung am gleichen Cytometer bei gleichen Einstellungen durchgeführt wurden, kann man anhand der Fluoreszenzintensitäten aber relativ innerhalb einer Studie die Expression eines Antigens angeben. Mit einem jeweils vor Messbeginn kalibrierten FACS-Gerät wäre durch die Fluoreszenzintensität einer genau definierten Menge von Antikörpern bestimmt worden und daraus das effektive Fluoreszenz-Antikörper-Verhältnis errechenbar. Da wir die

CD84-Expression hauptsächlich auf weiter differenzierten Vorläuferzellen nachweisen konnten, könnte dieser erhöhte CD84-Gehalt auf einen höheren Prozentsatz differenzierter Vorläuferzellen im „steady state“ peripheren Blut im Vergleich zu mobilisiertem peripheren Blut zurückzuführen sein.

Eine weitere Erklärung wäre, daß CD84 im Mobilisierungs- und Homing-Verhalten hämatopoetischer Vorläuferzellen involviert ist und daher CD84⁺ CD34⁺ Zellen in peripheren Blut gesunder Spender angereichert sind. Aufgrund des geringen Gehalts CD84⁺ Zellen nach G-CSF- und Chemotherapie-Mobilisierung könnte ein anderer Mobilisationsmechanismus mit G-CSF oder Chemotherapie bei mobilisierten CD34⁺ Vorläuferzellen vorliegen.

In den folgenden Experimenten wurden die funktionellen Eigenschaften von CD34⁺ CD84⁺ Vorläuferzellen und deren Immunphänotyp durch linienspezifische Oberflächenmarker analysiert.

Die verwendeten Marker CD10, CD19, CD41a, CD64 und CD71 identifizieren Vorläuferzellen für die lymphoide, megakaryozytäre, myelo-monozytäre und erythroide Differenzierungsrichtung. Während der Fc-γ Rezeptor I (CD64) fast ausschließlich auf myelo-monozytären Vorläuferzellen exprimiert wird und die meisten CFU-GM in der CD64⁺ CD34⁺-Subpopulation vorhanden sind (Olweus *et al.*, 1995), ist CD41a hauptsächlich auf megakaryozytären Vorläuferzellen vorhanden, obwohl CD34⁺ CD41a⁺ Zellen auch myeloisches Differenzierungspotential besitzen (Bruno *et al.*, 1998). CD10 und CD19 markieren lymphoide Vorläuferzellen (Galy *et al.*, 1995; Olweus *et al.*, 1994). CD71 ist für erythroide Vorläuferzellen charakteristisch (Olweus *et al.*, 1996).

Es konnte gezeigt werden, daß die Mehrheit dieser CD34⁺ Zellen in diesen Subpopulationen CD84 exprimiert, was auf die CD84-Expression auf weiter differenzierten Vorläuferzellen der erythroiden, myelo-monozytären, megakaryozytären und lymphoiden Differenzierungsrichtung hinweist. Dieses Expressionsmuster korreliert mit den Resultaten der Colony-Assays. Die CFU der CD84⁺ Subpopulation waren hauptsächlich erythroide BFU-E. Nur wenige myeloide CFU, größtenteils CFU-GM, wurden detektiert. CD84⁺ Vorläuferzellen bildeten insgesamt weniger Kolonien aber mit einem erhöhten Anteil myeloider Abstammung. Dies zeigt, daß nicht alle weiter differenzierten Vorläuferzellen CD84 exprimieren, obgleich die Mehrheit der detektierbaren CFU in der

CD34⁺ CD84⁺ Population ist. Auffällig war der hohe Anteil erythroider Kolonien im Vergleich zu den myeloiden Kolonien. Die Dominanz erythroider Vorläuferzellen und die relativ niedrige Zahl von CFU könnte auch von der Ausgangsquelle CD34⁺ Vorläuferzellen aus nicht mobilisiertem peripheren Blut herrühren.

Udomsakdi berichtet von einem ähnlichen Verhältnis von erythroiden zu myeloiden CFU für nicht-mobilisierte Vorläuferzellen. (Udomsakdi *et al.*, 1992), wohingegen Carlo-Stella bei Vorläuferzellen aus nicht mobilisiertem peripheren Blut äquivalente Zahlen von CFU-GM und BFU-E findet. Einige Gruppen berichten auch von niedrigeren Zahlen von CFU in peripheren Blut im Vergleich zu Knochenmark (Selleri *et al.*, 1999; Carlo-Stella *et al.*, 2000).

Im Megakaryozytenassay bilden CD34⁺ CD84⁺ Vorläuferzellen doppelt so viele CFU-Mk wie CD34⁺ Zellen. Dies bestätigt die Expression von CD84 auf der Mehrheit der CD41a⁺ CD34⁺ Zellen. Auch die CD84⁺ CD34⁺ Zellen bildeten in diesem Assay megakaryozytäre Kolonien, deren Zahl aber niedriger als bei den CD84⁻ CD34⁺ Zellen war. Da die CD84⁺ CD34⁺ Vorläuferzellen hauptsächlich kleine und mittlere Kolonien bildeten, die Mehrheit der von CD84⁻ CD34⁺ Zellen hervorgerufenen CFU-Mk große Kolonien waren, scheint die CD34⁺ CD84⁺ Population für primitive CFU-Mk angereichert zu sein, während sich die weiter differenzierten CFU-Mk in der CD34⁺ CD84⁺ Population befinden. Dies weist darauf hin, daß die Expression von CD84 im megakaryozytären Differenzierungsprozeß zunimmt. Es ist interessant, daß zum Ende des Differenzierungsvorgangs in nahezu allen Differenzierungslinien die CD84-Expression scheinbar abnimmt.

Reife Erythrozyten, Neutrophile und reife T-Lymphozyten exprimieren CD84 nicht, obwohl es möglich war, auf deren Vorläuferzellen CD84-Expression nachzuweisen. Jedoch wird CD84 auf T-Zellen mit Memoryzellphänotyp und auf Makrophagen im Lauf der Differenzierung hochreguliert. Im Vergleich zu den weiter differenzierten Vorläuferzellen konnte keine CD84-Expression auf CD34⁺ CD38⁻ Zellen detektiert werden. Desweiteren waren fast alle Zellen mit hoher proliferativer Kapazität in flüssiger Langzeitkultur in der CD84⁻ CD34⁺ Subpopulation enthalten. Diese Subpopulation hatte auch nach 4 Wochen in Flüssigkultur noch eine Fähigkeit zur Bildung myeloischer Kolonien. Sogar nach 12 Wochen wurden noch CD45-exprimierende proliferierende

Zellen in den Kulturen der CD84⁻ CD34⁺ Zellen gefunden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in stromazellbasierten Langzeitkulturen (LTC-IC) erhalten.

Limiting-Dilution-Experimente ergaben doppelt so viele LTC-IC in der CD84⁻ CD34⁺-Population wie bei CD34⁺ Zellen und fünfmal so viele LTC-IC wie bei den CD84⁺ CD34⁺ Zellen. Die Verwendung von CD34⁺ Zellen aus nicht mobilisiertem peripheren Blut resultiert in einer LTC-IC-Frequenz von 1 zu 332 CD34⁺ Zellen.

Selleri berichtet in seinen Untersuchungen vom CD34-Gehalt als auch von der LTC-IC-Zahl pro ml Blut. Die hierbei ermittelte Zahl von LTC-IC (= 1 LTC-IC pro 698 CD34⁺ Zellen) pro ml Blut ist vergleichbar zu den Daten bei Carlo-Stella, ist aber mehr als zweimal so hoch wie die Zahl von LTC-IC bei Udumsakdi (Selleri *et al.*, 1999; Carlo-Stella *et al.*, 2000; Udumsakdi *et al.*, 1992). Die errechnete Zahl von LTC-IC pro CD34⁺ Zellen entspricht nur der Hälfte der Zahl, die in den Versuchen dieser Arbeit ermittelt wurden. Diese Diskrepanz liegt entweder an den Stromazelllinien oder unterschiedlichen CD34-Aufreinigungsverfahren, die bei den Arbeitsgruppen Verwendung fanden. Diese Limiting-Dilution-Daten für die LTC-IC machen eine CD84-Expressionshochregulation während der Differenzierung von multipotenten Vorläuferzellen zu den differenzierten Vorläuferzellen der verschiedenen Linien wahrscheinlich.

Diese Hypothese wird durch Kulturexperimente mit CD84⁻ CD34⁺ Zellen bestätigt. Während der Gehalt an CD34⁺ Zellen langsam bis zum Zeitpunkt 72 h abnimmt, ist die CD84⁺ CD34⁺ Zellfraktion von unter 5 % auf über 95 % nach 72 h *in vitro* Kultur angestiegen. Dieses Experiment zeigt eine Hochregulation von CD84 auf CD34⁺ Zellen innerhalb der ersten 24 h und nach 3 Tagen koexprimieren fast alle CD34⁺ Zellen CD84.

Da bis dato keine Funktion von CD84 bekannt ist, ist die Rolle von CD84 im hämatopoetischen Differenzierungsprozeß spekulativ. Wie andere Mitglieder der CD2-Unterfamilie könnte CD84 bei der Adhäsionsinteraktion mit Stromazellen im Knochenmark involviert sein. Diese Interaktion könnte für Vorläuferzellen auf einer gewissen Differenzierungsstufe wichtig sein, ihre Nische im Stroma zu finden.

CD84 ist hauptsächlich auf differenzierten Vorläuferzellen unterschiedlicher Differenzierungsrichtungen exprimiert. Jedoch konnte keine Expression auf primitiven CD34⁺ CD84⁻ Zellen oder Zellen mit hohem proliferativen Potential gefunden werden. Die

CD84-Expression nimmt *in vitro* zu, bisher ist jedoch keine funktionelle Bedeutung für CD84 bekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß CD84 im Laufe der hämatopoetischen Differenzierung stark reguliert wird und daher vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung reifer Effektorzellen spielt.

4 Uniliniäre Differenzierung und inhibierende Faktoren

Da in normalen Kultursystemen oftmals große Mengen an akzessorischen Zellen vorhanden sind, die biologisch signifikante Mengen an endogenen Wachstumsfaktoren freisetzen und daher die Effekte von zugesetzten exogenen Zytokinen verwischen, wurden uniliniäre Kultursysteme zur Untersuchung von Effekten der Zytokine TGF- β , MIP-1- α und IFN- γ auf die linienspezifische Hämatopoese etabliert.

Basierend auf einer Publikation von Benedikt Ziegler (Universität Tübingen) konnten in modifizierter Weise ausgehend von aufgereinigten CD34⁺ Zellen aus peripherem Blut Eosinophile, Granulozyten, neutrophile Granulozyten und Mastzellen generiert werden (Ziegler *et al.*, 1998).

Eosinophile bzw. neutrophile Granulozyten bzw. Mastzellen erfüllen unterschiedliche Aufgaben der Immunabwehr und lassen sich morphologisch und immunphänotypisch unterscheiden.

Eosinophile modulieren allergische Entzündungsreaktionen und zerstören größere Parasiten. Die Aufenthaltsdauer dieser Zellen im Blut ist sehr kurz (3 bis 8 Stunden). Durch ihre intrazellulären eosinophilen Granula können diese terminal differenzierten Zellen *in vivo* leicht identifiziert werden. Phänotypisch werden die Eosinophilen durch die Expression von CD25⁺, CD49d⁺ und CD117⁺ beschrieben.

Neutrophile Granulozyten phagozytieren und zerstören in den Körper einwandernde Bakterien. Sie haben eine ähnliche Lebensdauer wie die Eosinophilen, sind aber mit einer Konzentration von 5×10^9 Zellen pro Liter Blut ungefähr 20 - 50 mal häufiger im Blutsystem vorhanden. Neutrophile sind CD16⁺ und lassen sich dadurch eindeutig von den Eosinophilen und Mastzellen unterscheiden.

Die Aufgabe der Mastzellen liegt ebenfalls in der Immunregulation und spielt vor allem bei Allergien eine wichtige Rolle. Mastzellen sind CD117⁺ sowie CD25⁻ und CD11c⁻.

Durch den Einsatz von liniendepletierten CD34⁺ Zellen ist es möglich, die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Effektorzellen zu verfolgen. Gerade die die Hämatopoese steuernden molekularen Mechanismen und deren Beeinflußbarkeit durch gezielte Zytokinzusätze können durch diese neue Methode beleuchtet werden.

Vorteil dieser uniliniären Differenzierungsmethode ist, daß nach einer dreiwöchigen Kulturdauer eine homogene Population hämatopoetischer Zellen mit genau definierten Eigenschaften und einem spezifischen Phänotyp entsteht. Diese uniliniären Kulturen bieten die Möglichkeit der Analyse von zellulären und molekularen Einflüssen auf diese eindeutig festgelegte Differenzierung.

Über positiv regulierende Zytokine wie G-CSF und TPO ist viel bekannt, wohingegen negativ regulierende Faktoren wie z. B. IFN- γ , MIP-1- α und TGF- β wenig erforscht sind.

Ziel unserer Arbeiten war es, den Einfluß dieser Faktoren auf die linienspezifische Differenzierung von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie Mastzellen zu untersuchen.

Um möglichst viele störende Faktoren auszuschließen und vor allem Zellen mit exklusiver Differenzierungsrichtung zu generieren, anhand derer man den Einfluß der inhibierenden Zytokine untersuchen kann, wurden also uniliniäre Kulturbedingungen gewählt. Für fast alle Blutzelllinien besteht unter bestimmten Kulturbedingungen in serumfreiem Medium die Möglichkeit, Zellen uniliniär differenzieren zu können.

Voraussetzung für uniliniäre Kulturen sind jedoch weitgehend undifferenzierte Vorläuferzellen, die über das Potential zur Differenzierung in die gewünschte Zelllinie verfügen. Um also eine möglichst reine, und von Zellen mit bereits festgelegtem Linienpotential freie, Population einzusetzen, werden von den Ausgangszellen Zellen mit linienspezifischen Markern abgetrennt. Die magnetische Zelltrennung erlaubt eine Isolierung von Zellen in Suspension nach ihren Oberflächenantigenen. Um differenzierte Vorläuferzellen abzutrennen und eventuelle interzelluläre „Beeinflussungen“ in einer heterogenen Ausgangspopulation auszuschließen, wurde eine liniendepletierte CD34-

Zellpopulation in diese Zellzüchtungskulturen eingesetzt. In Anlehnung an die Liniendepletionsmethode von Ziegler (Ziegler *et al.*, 1999a) wurde eine Aufreinigung von CD34-Zellen aus peripherem Blut auf durchschnittlich 84,7 % durchgeführt. Die Lin⁻ CD34⁺ Zellen nach der linienspezifischen Depletion mit einem durchschnittlichen Gehalt von 95,7 % CD34⁺ Zellen wurden in uniliniären Kulturen eingesetzt.

Mit einem vorgegebenen Wachstumsfaktorcocktail - wobei das steuernde Zytokin in hoher Konzentration zugefügt ist - wird eine uniliniäre Kultur ermöglicht. Hierdurch war es möglich in CellGro unter Zusatz von SCF (Stem Cell Factor, 10 ng/ml) Mastzellen zu generieren. Die Zugaben von TPO (Thrombopoietin, 100 ng/ml) bewirkte die Differenzierung zu Megakaryozyten. IL-5 (500 U/ml), GM-CSF (0,1 ng/ml) und IL-3 (1 U/ml) Zusätze generierten Eosinophile. Uniliniäre neutrophile Granulozyten-Wachstums-kulturen von CD34⁺ Lin⁻ Zellen wurden in serum-freien CellGro-Medium in IL-3 (1 U/ml), G-CSF (500 U/ml) und GM-CSF (0,1 ng/ml) durchgeführt. Dem jeweiligen Cocktail wurde 40 µg/ml LDL (Low Density Lipoprotein) zugefügt (Ziegler *et al.*, 1998).

Mittels eines Maus-anti-human Eosinophile Peroxidase-Antikörpers konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei den generierten Zellen in der Eosinophilenkultur tatsächlich um eosinophile Zellen handelte, obwohl die Zellen auf Zytospins nach Pappenheimfärbung nicht der üblichen Morphologie (Vakuolen und ein fein granuläres Erscheinungsbild) entsprachen. Auch in FACS-Analysen konnten Zellen mit Expression von CD49d und CD16 als eosinophile Granulozyten identifiziert werden (Elsner und Kapp, 1999).

Insbesondere die Effekte von TGF- β auf die Eosinophilengenerierung waren deutlich. TGF- β ist ein multifunktionaler hämatopoetischer Regulator, der entweder inhibierend oder fördernd auf das Wachstum hämatopoetischer Vorläuferzellen wirkt (Rosenfeld *et al.*, 1994; Fortunel *et al.*, 2000). Dieser Effekt scheint von der Anwesenheit anderer stimulierender Faktoren und dem Differenzierungszustand der Vorläuferzellen abzuhängen (Lemoli *et al.*, 1995; Murohashi *et al.*, 1995). Obwohl TGF- β Einfluß auf Vorläuferzellen aller Differenzierungsstufen hat (Mayani *et al.*, 1995), sind primitive Vorläuferzellen auch in Abwesenheit anderer Faktoren sensitiv für den inhibierenden Effekt (Keller *et al.*, 1994). Dieser Einfluß auf das Wachstumsverhalten wird teilweise

durch eine Beeinflussung des c-kit-Transkriptionsweges verursacht (Dubois *et al.*, 1994; Heinrich *et al.*, 1995). Darüber hinaus reguliert TGF- β wichtige Zellzyklusproteine und scheint Zellen im Zellzyklus arretieren zu können (Lardon *et al.*, 1994; Ando und Griffin, 1995; Sillaber *et al.*, 1992). TGF- β 1 und TGF- β 3 wirken im Gegensatz zu TGF- β 2 stark inhibierend auf hämatopoetische Vorläuferzellen (Jacobsen *et al.*, 1991; Sargicomo *et al.*, 1991; Lemoli *et al.*, 1995). Mittels der Pappenheimfärbetechnik konnten in unserem Ansatz bei den unter TGF- β 1-Zusatz kultivierten Zellen ausdifferenzierte Zellen mit azurophilen Granula detektiert werden. Inhibierend auf die Eosinophilenproduktion wirkte TGF- β (41,7 % weniger lebende Zellen), während Zusätze von IFN- γ (36,7 % mehr lebende Zellen) eine Steigerung der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. Durch MIP-1- α -Zusatz wurde kein signifikanter Effekt auf die Expansion verursacht (3,7 % mehr lebende Zellen). Die Wachstumsregulierung, unter Zusatz von blockierenden Antikörpern gegen IFN- γ , MIP-1 α und TGF- β , bewirkte eine deutliche Proliferationssteigerung.

Insbesondere bei Allergie- und Entzündungsreaktionen spielen Mastzellen und Eosinophile eine bedeutende Rolle (Clutterbuck *et al.*, 1989). An den Entzündungsherden sammeln sich große Mengen an diesen Zellen, wobei sich deren Zahl gerade in den bronchialen Bereichen innerhalb kurzer Zeit auf das mehr als Hundertfache vermehren kann (Elsner und Kapp, 1999). Ein besseres Verständnis der Differenzierungsvorgänge zu diesen Zellen und deren Beeinflussung durch Zytokine würde wesentlich zum Wissen über die Pathogenese und Aktivierungsmechanismen von allergischen Erkrankungen beitragen.

Auch bei der Generierung von Mastzellen in uniliniären Kulturen aus CD34⁺ Zellen bewirkte der Zusatz von TGF- β eine starke Wachstumsinhibierung von 53 % im Vergleich zur Kontrolle. MIP-1- α Zusatz führte zu einer Proliferationsreduktion von 26,6 %.

Auch MIP-1- α ist ein pleiotropes Zytokin, das als Chemoattraktant für Granulozyten und Lymphozyten in Entzündungsreaktionen fungieren kann. Zugleich ist MIP-1- α aber auch ein inhibierendes Chemokin für primitive Vorläuferzellen (Bug *et al.*, 1998). In unseren uniliniären Kulturexperimenten, konnten wir zeigen, daß MIP-1- α sowohl inhibierende,

als auch stimulierende Wirkung bei uniliniären Differenzierungen zu Mastzellen, Eosinophile und Granulozyten ausübt. Die Rolle von MIP-1- α bei der Regulation der hämatopoetischen Vorläuferzellen ist abhängig vom Grad der Differenzierung. In reiferen Vorläuferzellen steigert MIP-1- α beispielsweise die Koloniebildung in Gegenwart anderer Wachstumsfaktoren (Rollins, 1996). Insbesondere der Einfluß von MIP-1- α auf das Knochenmark-Mikromilieu hat eine entscheidende Bedeutung für die frühe Hämatopoese (Cook DN, 1996).

Der Proliferationssteigerungseffekt von IFN- γ auf die Mastzellgenerierung war nur 7,1 % verglichen mit der Kontrolle. Die blockierenden Antikörper gegen IFN- γ , MIP-1- α und TGF- β bewirkten Zellzahlen, die im Bereich der Schwankungsbreite der Kontrolle lagen (keine signifikante Änderung). Die Zugabe von neutralisierendem Antikörper für TGF- β hatte keine starke Proliferationssteigerung zur Folge, erzielte jedoch im Vergleich zu TGF- β -Zytokinzugabe eine Verdoppelung der Zellzahl. Wie bei den Mastzellen und Eosinophilen bewirkte TGF- β auch bei der Generierung von Granulozyten in uniliniären Kulturen aus CD34⁺ Zellen eine starke Wachstumsinhibierung von 66,2 % im Vergleich zur Kontrolle. MIP-1- α -Zusatz führte zu keiner signifikanten Veränderung der Expansionsrate (Reduktion um 5 %). Der Proliferationssteigerungseffekt von IFN- γ auf die Granulozytengenerierung war 23,6 % verglichen mit der Kontrolle. Durch durchflußzytometrische Analyse (CD16) konnte die Generierung von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. CD16 ist auf Mastzellen und Eosinophilen negativ und nur auf Granulozyten stark vorhanden. Zusätzlich wurde noch CD15 als Positivmarker verwendet. Auffällig war, daß die Zugabe von neutralisierendem Antikörper für TGF- β keine starke Proliferationssteigerung zur Folge hatte, jedoch im Vergleich zur TGF- β -Zytokinzugabe eine Verdopplung der Zellzahl erzielte. Snoeck *et al.* konnten zeigen, daß IFN- γ die Proliferation von sehr primitiven CD34⁺⁺ CD38⁻ Zellen und nicht von reiferen CD34⁺ CD38⁺ fördert. IFN- γ ist ein sehr selektiver hämatopoetischer Stammzell-Regulator, der zugleich auch das Überleben von CD34⁺⁺ CD38⁻ Zellen sicherstellt (Snoeck *et al.*, 1994). Abhängig von der jeweiligen Zielzelle, bzw. vermutlich deren Rezeptorstatus, agiert IFN- γ , was auch in diesen uniliniären Kulturen gezeigt werden konnte.

Da IFN- γ ein inflammatorisches Zytokin ist, welches zur gleichen Zeit das Zellwachstum in uniliniären Kulturen hemmen, Zelltod induzieren und stark die Expansion weiterer Vorläuferzellen stimulieren kann, könnte dies die Erklärung dafür sein, daß IFN- γ in bestimmten Situationen in denen eine größere „Nachfrage“ nach Blutzellen im Organismus aufgrund einer Entzündung oder Infektion besteht Proliferation und Differenzierung zu reifen Zellen fördert und zugleich aber sehr primitive Zellen in einem Zellzyklusarrest verweilen läßt. Sicherlich ist der bei den uniliniären Kulturen aufgetretenen inhibierende Effekt auf diesen direkten Effekt auf sehr primitive Stammzellen zurückzuführen.

E Zusammenfassung

Bei durchflußzytometrischen Subpopulationsanalysen von CD34⁺ Zellen aus nicht mobilisiertem peripheren Blut konnte ein erhöhter Gehalt an CD34⁺ CD32⁺ Vorläuferzellen ($37,57 \pm 15,64 \%$) im Vergleich zu den anderen Stammzellquellen, Knochenmark, Nabelschnurblut und mobilisiertem Blut festgestellt werden. CD34⁺ CD64⁺ megakaryozytäre Vorläuferzellen wiesen einen erhöhten Gehalt von $8,49 \pm 1,73 \%$ in Knochenmark gegenüber mobilisierten peripheren Blut ($1,93 \pm 9,05 \%$), Nabelschnurblut ($2,79 \pm 1,72 \%$) und nicht mobilisierten Blut ($6,4 \pm 4,8 \%$) auf. Für die lymphatischen Vorläuferzellen CD34⁺ CD10⁺ wurde der höchste Prozentwert in Knochenmark detektiert ($18,45 \pm 6,39 \%$), während unmobilisiertes peripheres Blut mit nur $2,55 \pm 1,83 \%$ den niedrigsten Gehalt aufweist. Bei den primitiven CD34⁺ CD38⁺ Vorläuferzellen war beim mobilisierten peripheren Blut mit $0,99 \pm 0,06 \%$ am höchsten, wobei aber auch Knochenmark ($0,77 \pm 0,41 \%$) und Nabelschnurblut ($0,9 \pm 0,08 \%$) einen etwa vierfachen Prozentgehalt im Vergleich zu peripherem Blut gesunder Spender ($0,23 \pm 0,03 \%$) hatten. CD34-Zellen aus Knochenmark, Nabelschnurblut, peripherem Blut mobilisierter und nicht mobilisierter Spender haben unterschiedliche Zusammensetzungen und müssen daher gesondert betrachtet werden.

Die Untersuchung hämatopoetischen Vorläufer- und Stammzellen wird durch die geringe Zahl dieser Zellen im Ausgangsmaterial erheblich erschwert. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Einzelzell-PCR-Methode mittels Oligo (dT) gekoppelter magnetischer Partikel erlaubt die Analyse mehrerer verschiedener Gene aus einer Zelle. Die mRNA einer Zelle und die daraus synthetisierte cDNA wird nach jeder Amplifikation mit Hilfe eines Magneten wiedergewonnen. Mittels dieser Technik konnte in CD34⁺ Einzelzellen auf mRNA die Expression von β -Actin, CD34 und einigen anderen Genen nachgewiesen werden. Die RNA-Expressionsdaten von CD34-Subpopulationen stellen eine Möglichkeit dar, diese von anderen Populationen abzugrenzen. Auch in CD34⁺ CD10⁺ humanen Vorläuferzellen war die Detektion von β -Actin und CD34 möglich, wobei TGF- β I, TGF- β RII, TGF- β RIII, MIP-1 α , CCRI, CCRIV, CCRV, IFN- γ und IFN- γ R nicht detektierbar waren. Die RNA-Expression CD34⁺ Vorläuferzellen spiegelt die Heterogenität der CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellpopulation wieder.

CD84 ist ein zur CD2-Unterfamilie der Ig-Superfamilie gehörendes Glykoprotein mit unbekannter Funktion. Mittels FACS konnte gezeigt werden, daß die CD84-Expression in Knochenmark ($34,1 \pm 8,1 \%$) im Vergleich zu peripheren Blut G-CSF-mobilisierter ($45,8 \pm 1,5 \%$) und gesunder Spender ($63,6 \pm 4,7 \%$) auf CD34⁺ Vorläuferzellen unterschiedlich ist. CD34⁺ Zellen welche die linienspezifischen Antigene CD19, CD41a, CD64 und CD71 koexprimierten waren alle CD84⁺. Im Methylzellulose-Assay bildeten CD34⁺ CD84⁺ Zellen hauptsächlich erythroide Kolonien, die CD34⁺ CD84⁻ Zellen produzierten in diesem Assay insgesamt weniger Kolonien mit relativ vielen myeloiden Ursprungs. Im Megakaryozyten-Assay war die Zahl von durch beide Subpopulationen gebildeten megakaryozytären Kolonien ähnlich, wobei aber die CD84⁻ Vorläuferzellen mehr große Kolonien mit mindestens 50 Zellen hervorriefen ($62 \pm 17 \%$ versus $35 \pm 12 \%$). In einer serumfreien Kurzzeitkultur verlor ein Viertel der eingesetzten CD34⁺ CD84⁻ Zellen bereits nach 3 Tagen das CD34-Antigen, wobei dann aber 95 % der CD34⁺ Zellen das CD84-Antigen exprimierten. Auch die LTC-IC-Frequenz (1 in 183 CD34⁺ CD84⁻ im Vergleich zu 1 in 942 CD34⁺ CD84⁺ PBMC) zeigt, daß die CD84-Expression auf CD34⁺ Vorläuferzellen mit hohem Proliferationspotential niedrig ist. Aufgrund der differentiellen Regulation der CD84-Expression auf reifen Effektorzellen läßt sich eine wichtige Funktion von CD84 im Bereich der frühen Hämatopoese vermuten. Vielleicht spielt CD84 bei der Mobilisation oder der Transmigration von CD34⁺ Vorläuferzellen ins periphere Blut eine bedeutende Rolle.

In uniliniären Differenzierungskulturen aus CD34⁺ Lin⁻ Zellen konnten Eosinophile und Mastzellen generiert werden. Unter Zusatz von IFN- γ , MIP-1 α und TGF- β wurde der Einfluß dieser Zytokine auf die uniliniäre Differenzierung in *in vitro* Kulturen ermittelt. Inhibierend auf die Eosinophilenproduktion wirkte TGF- β (41,7 % weniger lebende Zellen), während Zusätze von IFN- γ (36,7 % mehr lebende Zellen) und MIP-1 α (3,7 % mehr Zellen) eine Steigerung der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. Auffällig waren die stärker ausdifferenzierten Zellen mit azurophilen Granula bei den Eosinophilenkulturen mit TGF- β -Zusatz. Auch bei der Generierung von Mastzellen in uniliniären Kulturen bewirkte der Zusatz von TGF- β eine starke Wachstumsinhibierung von 53 % im Vergleich zur Kontrolle. MIP-1 α -Zusatz führte zu einer Proliferationsreduktion von 26,6 %. Der Proliferationssteigerungseffekt von IFN- γ auf die Mastzellgenerierung war gering.

F Literaturverzeichnis

- **Abbas AK, Lichtmann A und Pober J (1996).** Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Company, Philadelphia
- **Altschul S, Stephen F, Madden TL, Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W und Lipman J (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programmes. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389 – 3402
- **Ando K und Griffin J (1995).** Cdk4 integrates growth stimulatory and inhibitory signals during G1 phase of haematopoietic cells. *Oncogene* **10**: 751 - 755
- **Andreesen R, Bross KJ, Osterholz J und Emmrich F (1986).** Human macrophage maturation and heterogeneity: analysis with a newly generated set of monoclonal antibodies to differentiation antigens. *Blood* **67**: 1257 – 1264
- **Andreesen R, Gadd S, Costabel U, Leser H, Speth V, Cesnik B und Atkins RC (1988).** Human macrophage maturation and heterogeneity: restricted expression of late differentiation antigens in situ. *Cell Tissue Res* **253**: 2712 - 279
- **Andreesen R, Mackensen A, Osterholz J, Brugger W und Lohr GW (1988).** Microculture assay for human macrophage maturation in vitro. Cell-ELISA analysis of differentiation antigen expression. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **86**: 281 – 287
- **Baech J und Johnsen HE (2000).** Technical Aspects and Clinical Impact of Hematopoietic Progenitor Subset Quantification. *Stem Cells* **18**: 76 - 86
- **Basch RS, Zhang XM, Dolzhanskiy A und Karpatskin S (1999).** Expression of CD41 and c-mpl does not indicate commitment to the megakaryocyte lineage during haematopoietic development. *Br J Haematol* **105**: 1044 – 1054
- **Bender JG, Lum L, Umverzag KL, Lee W, van Epps D, George S, Coon J, Ghalie R, McLeod B und Kaizer H (1994).** Correlation of colony-forming cells, long-term culture initiating cells and CD34⁺ cells in apheresis products from patients mobilized for peripheral blood progenitors with different regimens. *Bone Marrow Transplant* **13**: 479 - 485
- **Benedetti G, Bondesan P, Caracciolo D, Cherasco C, Ruggieri D, Gastaldi ME, Pileri A, Gianni AM und Tarella C (1994).** Selection and characterization of early hematopoietic progenitors using an anti-CD71/S06 immunotoxin. *Exp Hematol* **22**: 166 - 173
- **Berardi AC, Wang A, Levine JD, Lopez P und Scadden DT (1995).** Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science* **267**: 104 - 108

- **Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D und Dick JE (1997).** Purification of primitive hematopoietic stem cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad USA* **94**: 5320 - 5325
- **Bochner BS, Sterbinsky SA, Saini SA, Columbo M und MacGlashan DW (1997).** Studies of cell adhesion and flow cytometric analyses of degranulation, surface phenotype and viability using human eosinophils, basophils and mast cells. *Comp Method Enzym* **13**: 61- 68
- **Bockhold K, Petzer A, Eaves CJ und Hogge DE (1995).** Growth factor requirements and phenotypic characterization of human megakaryocyte (Mk) progenitors. *Blood (Suppl. 1)* **86**: 364a
- **Broxmeyer HE und Kim CH (1999).** Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with plethora of redundant activities. *Exp Hematol* **27**: 1113 - 1123
- **Brugger W, Scheibenbogen C, Krause S und Andreessen R (1991).** Large-scale production of human tumoricidal macrophages grown from blood monocytes of cancer patients. *Cancer Detect Prev* **15**: 407 – 412
- **Bruno E und Hoffman R (1998).** Human megakaryocyte progenitor cells. *Semin Hematol* **35**: 183 – 191
- **Bug G, Aman MJ, Tretter T, Huber C, und Peschel C (1998).** Induction of macrophage-inflammatory protein 1-alpha (MIP-1-alpha) by interferon-alpha. *Exp Hematol* **26**: 117 - 123
- **Carlo-Stella C, Cesana C, Regazzi E, Falzetti F, Aversa F, Rizzoli V, Martelli M und Tabilio A (2000).** Peripheral blood progenitor cell mobilization in healthy donors receiving recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Exp Hematol* **28**: 216 – 224
- **Chang Q, Harvey K, Akard L, Thompson J, Dugan MJ, English D und Jansen J (1997).** Differences in CD34⁺ cell subpopulations between human bone marrow and „mobilized“ peripheral blood as determined with counterflow centrifugal elutriation. *Exp Hematol* **25**: 423 - 431
- **Cho SH, Chung IJ, Lee JJ, Park ML und Kim HJ (1999).** Comparison of CD34⁺ subsets and clonogenicity in human bone marrow, granulocyte colony-stimulation factor-mobilized peripheral blood and cord blood. *J Korean Med Sci* **14**: 520 – 525
- **Ciudad J, Orfao A und Vidrales B (1998).** Immunophenotypic analysis of CD19⁺ precursors in normal adult bone marrow: implications for minimal residual disease detection. *Haematologica* **83**: 1069 – 1075
- **Civin CI, Almeida-Porada G, Lee MJ, Olweus J, Terstappen LW und Zanjani ED (1996).** Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo. *Blood* **88**: 4102 – 4109

- **Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF und Shaper JH (1984).** Antigenic analysis of hematopoiesis. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG1 cells. *J Immunol* **133**: 157 – 163
- **Clutterbuck EJ, Hirst EM und Sanderson CJ (1989).** Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF. *Blood* **73**: 1504 – 1512
- **Clutterbuck EJ, Sanderson CJ (1990).** Regulation of human eosinophil precursor production by cytokines: a comparison of recombinant human interleukin-1 (rhIL-1), rhIL-3, rhIL-5, rhIL-6, and rh granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **75**: 1774 – 1779
- **Cock DN (1996).** The role of MIP-1 α in inflammation and hematopoiesis. *J Leukocyte Bio* **59**: 61– 68
- **D'Arena G, Cascavilla N, Musto P, Greco M, Di Mauro L, Carella AM, Dello Iacono N und Carotenuto M (1996).** Flow cytometric characterization of CD34⁺ hematopoietic progenitor cells in mobilized peripheral blood and bone marrow of cancer patients. *Haematologica* **81**: 216 – 223
- **Debili N, Wendling F, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, Hunt P und Vainchenker W (1995).** The mpl-ligand or thrombopoietin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors. *Blood* **86**: 2516 – 2525
- **De Bruyn C, Delforge A, Lagneaux L und Bron D (2000).** Characterization of CD34⁺ subsets derived from bone marrow, umbilical cord blood and mobilized peripheral blood after stem cell factor and interleukin 3 stimulation. *Bone Marrow Transplant* **25**: 377 – 383
- **De la Fuente MA, Pizcueta P, Nadal M, Bosch J und Engel P (1999).** Molecular cloning, characterization and chromosomal localization of the mouse homologue of CD84, a member of the CD2 family of cell surface molecules. *Immunogenetics* **4**: 249 – 255
- **De la Fuente MA., Pizcueta P und Engel P (1997).** CD84 Workshop Panel report. in Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AE, Goyert SM, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamura K und Zola H. Leukocyte Typing VI, White Cell Differentiation Antigens, Proceedings of the Sixth International Workshop and Conference. New York, London, Garland Publishing. 193 – 194
- **De-long MO, Wagemaker G und Wognum AW (1995).** Separation of myeloid and erythroid progenitors based on expression of CD34 and c-kit. *Blood* **86**: 4076 – 4085
- **Dercksen MW, Rodenhuis S, Dirkson MK, Schaasberg WP, Baars JW, von der Wall E, Slaper-Cortenbach C, Pinedo HM, von dem Borne AE und van der**

- Schoot CE (1995). Subsets of CD34⁺ cells and rapid hematopoietic recovery after peripheral blood stem cell transplantation. *J Clin Oncol* 13: 1922 - 1932
- De Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Cyalton A, Rafferty JA, Burt D, Guenechea GG, Bueren JA, Gargaen D, Fairbairn LJ, Lord BI und Testa NG (1998). CD34⁺ AC133⁺ Cells Isolated from Cord Blood are Highly Enriched in Long-Term Culture-Initiating Cells, NOD/SCID-Repopulating Cells and Dendritic Cell Progenitors. *Stem Cells* 16: 387 - 396
 - Dick JE, Bhatia M, Gan O, Kapp U und Wang JC (1997). Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice. *Stem Cells* 15: 199 - 203
 - Dubois CM, Ruscetti FW, Stankova J und Keller JR (1994). Transforming growth factor-beta regulates c-kit message stability and cell-surface protein expression in hematopoietic progenitors. *Blood* 83: 3138 - 3145
 - Eaves CJ und Eaves AC (1999). Terry Fox Laboratory Protocols Volume I: Stem cell assays, FACS, Genetransfer. Vancouver
 - Eaves CJ, Cashman ID und Eaves AC (1991). Methodology of long-term culture of human hemopoietic cells. *J Tissue Culture Methods* 13: 55 - 62
 - Ellies LG, Jones AT, Williams MJ und Ziltener HJ (1994). Differential regulation of CD43 glycoforms on CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in graft-versus-host disease. *Glycobiology* 4: 885 - 893
 - Elsner J und Kapp A (1999). Regulation and modulation of eosinophil effector functions. *Allergy* 54: 15 - 26
 - Engel P, Wagner N und Tedder TF (1995). CDw84 Workshop report. Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein R, Springer R, Tedder TF und Todd RF. Leukocyte Typing V, White Cell Differentiation Antigens, Proceedings of the Fifth International Workshop and Conference. Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press; 699 - 700
 - Fanning SF, Hogge DE und Eaves CJ (1993). Identification of megakaryocyte progenitors in human long-term marrow cultures quantitated using an improved assay for megakaryocyte colony-forming cells. *Blood (Suppl. 1)* 82: 70a
 - Fortunel NO, Hatzfeld A und Hatzfeld JA (2000). Transforming growth factor-β: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* 96: 2022 - 2036
 - Fritsch G, Stimpfl M, Kurz M, Printz D, Buchinger P, Fischmeister G, Hoecker P und Gadner H (1996). The composition of CD34 subpopulations differs between bone marrow, blood and cord blood. *Bone Marrow Transplant* 17: 169 - 178
 - Gabbianelli M, Pelosi E, Montesoro E, Valtieri M, Luchetti L, Samoggia P, Vitelli L, Barberi T, Testa U, Lyman S und Peschle C (1995). Multi-Level Effects of flt3 Ligand on human hematopoiesis: Expansion of putative stem cells and

- Proliferation of Granulomonocytic Progenitors/Monocytic Precursors. *Blood* **86**: 1661 – 1670
- **Galy A, Travis M, Chen D und Chen B (1995).** Human T-, B-, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* **3**: 459 – 473
 - **Gounni AS, Gregory B, Nutku E, Aris F, Latifa K, Minshall E, North J, Tavernier J, Levit R, Nicolaides N, Robinson D und Hamid Q (2000).** Interleukin-9 enhances interleukin-5 receptor expression, differentiation and survival of human eosinophils. *Blood* **96**: 2163 – 2171
 - **Graham GJ und Wright EG (1997).** Haemopoietic stem cells: their heterogeneity and regulation. *Int J Exp Pathol* **78**: 197 – 218
 - **Graw RG, Herzig GP, Eisel RJ und Perry S (1971).** Leucocyte and platelet collection from normal donors with the continuous flow blood cell separator. *Transfusion* **11**: 94 – 98
 - **Haase R, Mohle R, Fruehauf S, Goldschmidt H, Witt B, Flentje M, Wannemacher M und Hunstein W (1994).** Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. *Blood* **83**: 3787 – 3794
 - **Hagiwara T, Kodama I, Horie K, Kato T und Miyazaki H (1998).** Proliferative properties of human umbilical cord blood megakaryocyte progenitor cells to human thrombopoietin. *Exp Hematol* **26**: 228 – 235
 - **Hardy RR und Hayakawa K (1986).** Development and physiology of Ly-1 B and its human homologue, Leu-1 B. *Immunol Rev* **93**: 53 – 79
 - **Heckner F (1986).** Praktikum der mikroskopischen Hämatologie. 6. Auflage. Urban & Schwarzenberg, München
 - **Heinrich MC, Dooley DC und Keeble W (1995).** Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of the gene products for steel factor and its receptor (c-kit). *Blood* **85**: 1769 – 1780
 - **Heinz S (1996).** Biochemische Charakterisierung neuer durch monoklonale Antikörper definierter reifungsassoziiierter Makrophagenantigene. Diplomarbeit an der Universität Regensburg
 - **Hogge D, Lansdorp PM, Reid D, Gerhard B und Eaves CJ (1996).** Enhanced Detection, maintenance and differentiation of primitive human hematopoietic cells in cultures containing murine fibroblasts engineered to produce human steel factor, interleukin-3 and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **88**: 3765 – 3773
 - **Hogge D, Fanning S, Bockhold K, Petzer A, Lambie K, Lansdorp PM, Eaves A und Eaves C (1997).** Quantitation and characterization of human megakaryocyte

colony-forming cells using a standardized serum-free agarose assay. *Br J Haematol* **96**: 790 - 800

- **Hume DA (2000).** Probability in transcriptional regulation and its implications for leukocyte differentiation and inducible gene expression. *Blood* **96**: 2323 -2328
- **Jacobsen SE, Keller JR, Ruscetti FW, Kondoiah P, Roberts AB und Falk LA (1991).** Bidirectional effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on colony-stimulating factor-induced human myelopoiesis in vitro: differential effects of distinct TGF-beta isoforms. *Blood* **78**: 2239 - 2247
- **Johnson WD, Mei B und Cohn ZA (1977).** The separation, long-term cultivation and maturation of the human monocyte. *J Exp Med* **146**: 1613 - 1618
- **Keller G (1992).** Hematopoietic stem cells. *Curr Opin Immunol* **4**: 133 - 139
- **Keller G (1992a).** Clonal analysis of hematopoietic stem cell development in vivo. *Curr Top Microbiol Immunol* **177**: 41 - 57
- **Keller IR, Bartelmez SH, Sitnicka E, Ruscetti FW, Ortiz M, Gooya JM und Jacobsen SE (1994).** Distinct and overlapping direct effects of macrophage inflammatory protein-1 α and transforming growth factor beta on haematopoietic progenitor / stem cell growth. *Blood* **84**: 2175 - 2181
- **Kögler G, Callejas J, Sorg RV, Fischer J, Migliacciao A und Wernet P (1998).** The effect of different thawing methods, growth factor combinations and media on ex vivo expansion of umbilical blood primitive and committed progenitors. *Bone Marrow Transplant* **21**: 233 - 241
- **Koller MR, Emerson SG und Palsson BO (1993).** Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures. *Blood* **82**: 378 – 384
- **Kondo M, Scherer DC, Miyamoto T, King AG, Akashi K, Sugamura K und Weissman IL (2000).** Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature* **407**: 383 - 386
- **Krause DS, Fackler MJ, Civin CJ und Stratford MW (1996).** CD34: Structure, Biology and Clinical Utility. *Blood* **87**: 1 – 13
- **Krause SW, Rehli M, Heinz S, Ebner R und Andreesen R (2000).** Characterization of Max3 antigen, a glycoprotein expressed on mature macrophages, dendritic cells and blood platelets: Identity with CD84. *Biochem J* **346**: 729 – 736
- **Lansdorp PM und Dragowska W (1992).** Long-term erythropoiesis from constant numbers of CD34⁺ cells in serum-free cultures initiated with highly purified progenitor cells from human bone marrow. *J Exp Med* **175**: 1501 – 1509

- **Lardon F, Snoeck HW, Nijs G, Lenjon M, Peetermans ME, Rodrigus J, Berneman ZN und Van Bockstaele DR (1994).** Transforming growth factor beta regulates the cellcycle status of interleukin-3 (IL-3) plus IL-1, stem cell factor, or IL-6 stimulated CD34⁺ human haematopoietic progenitor cells through different cell kinetic mechanisms depending on the applied stimulus. *Exp Hematol* **22**: 903 - 909
- **Lemoli RM, Fogli M, Fortuna A und Tura S (1995).** Interleukin-11 und Interleukin-9 counteract the inhibitory activity of transforming growth factor beta 3 (TGF-beta 3) on human primitive haematopoietic progenitor cells. *Haematologica* **80**: 5 - 12
- **Le Pecq JB und Paoletti C (1967).** A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization. *J Mol Biol* **27**: 87 - 93
- **Lucio P, Parreira A, van den Beemd MW, van Lochem EG, van Wering ER, Baars E, Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Gaipa G, Biondi A, Orfao A, Janossy G, van Dongen JJ und San Miguel JF (1999).** Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia* **13**: 419 - 427
- **Macklis JM und Madison RD (1990).** Progressiv incorporation of propidium iodid in cultured mouse neuron correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. *J Neurosci Methods* **31**: 43 - 46
- **Mayani H, Guilbert LJ und Janowska-Wieczorek A (1992).** Biology of the hematopoietic microenvironment. *Eur J Hematol* **49**: 225 - 233
- **Mayani H, Little MT, Dragowska W, Thornbury G und Lansdorp PM (1995).** Differential effects of the haematopoietic inhibitors MIP-1 α , TGF-beta and TNF-alpha on cytokine-induced proliferation of subpopulations of CD34⁺ cells purified from cord blood and fetal liver. *Exp Hematol* **23**: 422- 427
- **McAdams TA, Miller WM, Papoutsakis ET (1996).** Hematopoietic cell culture therapies (Part I): Cell culture considerations. *Trends Biotechnol* **14**:341-9.
- **McAdams TA, Winter J, Miller WM und Papoutsakis ET (1996).** Hematopoietic cell culture therapies (Part II): Clinical aspects and applications. *Trends Biotechnol* **14**: 388 - 396
- **Messner H (1998).** Human Hematopoietic Progenitor in Bone Marrow and Peripheral Blood. In „Characteristics and Potentials of Blood Stem Cells“ edited by Flidner T und Hoelzer D, Alpha Med Press, Mianisburg, USA. *Stem Cells* **16** (1): 93 - 97
- **Metcalf D (1984).** Clonal culture of hematopoietic cells: techniques and applications. Elsevier, Amsterdam

- **Miltenyi S, Müller W, Weichel W und Radbruch A (1990).** High Gradient Magnetic Cell Separation with MACS. *Cytometry* **11**: 231 – 239
- **Mullis K, Falcona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **512**: 263 – 273
- **Murohashi J, Endho K, Nishida S, Yoshida S, Iinai J, Bessho M und Hirashima K (1995).** Differential effects of TGF-beta1 on normal and leukemic human haematopoietic cell proliferation. *Exp Hematol* **23**: 970 - 977
- **Murray LJ, Luens KM, Estrade MF, Bruno E, Hoffman R, Cohen RL, Ashby MA und Vadhan-Raj S (1998).** Thrombopoietin mobilizes CD34⁺ cell subsets into peripheral blood and expands multilineage progenitors in bone marrow of cancer patients with normal hematopoiesis. *Exp Hematol* **26**: 207 - 216
- **Olweus J, Lund Johansen F und Terstappen LW (1995).** CD64/Fc gamma R I is a granulocyte-monocytic lineage marker on CD34⁺ hematopoietic cells. *Blood* **85**: 2402 – 2413
- **Olweus J, Lund Johansen F und Terstappen LW (1994).** Expression of cell surface markers during differentiation of CD34⁺, CD38^{-lo} fetal and adult bone marrow cells. *Immunomethods* **5**: 179 – 188
- **Olweus J, Terstappen LW, Thompson PA und Lund-Johansen F (1996).** Expression and function of receptors for stem cell factor and Erythropoietin during lineage commitment of human hematopoietic progenitor cells. *Blood* **88**: 1594 - 1607
- **Pettengell R, Morgenstern GR, Woll PJ, Chang J, Rowlands M, Radford JA, Scarffe JH, Testa NG und Crowther D (1993).** Peripheral blood progenitor cell transplantation in lymphoma and leukemia using a single apheresis. *Blood* **82**: 3770
- **Rehli M, Krause SW, Kreutz M und Andreessen R (1995).** Carboxypeptidase M is identical to the Max1 antigen and its expression is associated with monocyte to macrophage differentiation. *J Biol Chem* **270**: 15644 - 15649
- **Roberts AW, Zaiss M, Boyd AW und Nicola NA (1997).** G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells: *in vitro* growth pattern and hematopoietic growth factor receptor profile. *Exp Hematol* **25**: 298 – 305
- **Rollins BJ (1997).** Chemokines. *Blood* **90**: 909 – 928
- **Rosenfeld S (1994).** Transforming growth factor-beta1 augments macrophage-colony stimulating factor activity on human marrow. *Stem Cells* **12**: 527 - 532
- **Roy V und Verfaillie CM (1999).** Expression and function of cell adhesion molecules on fetal liver, cord blood and bone marrow hematopoietic progenitors: Implications for anatomical localization and developmental stage specific regulation of hematopoiesis. *Exp Hematol* **27**: 302 -312

- Sanderson RJ, Shepperdson FT, Vatter AE und Talmage K (1977). Isolation and enumeration of peripheral blood monocytes. *J Immunol* **118**: 1409 - 1412
- Sargiacomo M, Valtieri M, Gabbianelli M, Pelosi E, Testa U, Camagna A und Peschle C (1991). Pure human haematopoietic progenitors. Direct inhibitory effect of transforming growth factors beta 1 and beta 2. *Annals of the New York Academy of Sciences* **628**: 84 - 91
- Schering AG (2000). Tumorforschung. Berlin
- Selleri C, Maciejewski JP, De Rosa G, Raiola A, Risitano AM, Picardi M, Pezzullo L, Luciano L, Ricci P, Varriale G, Della Cioppa P, Del Vecchio L und Rotoli B (1999). Long lasting decrease of marrow and circulating long-term culture initiating cells after allogeneic bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant* **23**: 1029 - 1037
- Shapiro HM (ed) (1994). Practical Flow Cytometry. 3rd edition, Wiley-Liss, New York
- Sillaber C, Geissler K, Scherrer R, Kaltenbrunner R, Bettelheim P, Lechner K, and Valent P (1992). Type beta transforming growth factors promote interleukin-3 (IL-3)- dependent differentiation of human basophils but inhibit IL-3-dependent differentiation of human eosinophils. *Blood* **80**: 634 - 641.
- Skubitz KM, Wehner NG und Gray BH (1988). Preparation and characterization of a monoclonal antibody that inhibits human neutrophil elastase activity. *J Leukocyte Bio* **44**: 158 - 165
- Snoeck HW, Van Bockstaele DR, Nys G, Lenjou M, Lardon F, Haenen L, Rodrigus I, Peetermans ME und Berneman ZN (1994). Interferon-gamma Selectively Inhibits Very Primitive CD34⁺ CD38⁻ and Not More Mature CD34⁺ CD38⁺ Human Hematopoietic Progenitor Cells. *J Exp Med* **180**: 1177 - 1182
- Socolovsky M, Lodish HF und Daley GQ (1998). Control of hematopoietic differentiation: lack of specificity in signaling by cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6573 - 6575
- Soma T, Yu JM und Dunbar CE (1996). Maintenance of Murine Long-Term Repopulating Stem Cells in Ex Vivo Culture Is Affected by Modulation of Transforming Growth Factor- β But Not Macrophage Inflammatory Protein-1-alpha Activities. *Blood* **87**: 4561 - 4567
- Storms RW, Goodell MA, Fisher A, Mulligan RC und Smith C (2000). Hoechst dye efflux reveals a novel CD7⁺ CD34⁻ lymphoid progenitor in human umbilical cord blood. *Blood* **96**: 2125 - 2133
- Su S, Mukaida N, Wang J, Zhang Y, Takami A, Nakao S und Matsushima K (1997). Inhibition of Immature Erythroid Progenitor Cell Proliferation by

Macrophage Inflammatory Protein-1 α by Interacting Mainly with a C-C Chemokine Receptor, CCR1. *Blood* **90**: 605 – 611

- **Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R und Chin-Yee I (1996).** The ISHAGE Guidelines for CD34 Cell Determination by Flow Cytometry (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering). *J Hematotherapy* **5**: 213 – 226
- **Sutherland DR, Eaves AC und Eaves CJ (1991).** Quantitative Assays for human hematopoietic progenitor cells. in: „Bone marrow processing and purging: A practical guide“ (ed Gee AP). CRC Press Inc., Boca Raton. 155 – 171
- **Sutherland DR, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W und Lansdorp PM (1989).** Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* **74**: 1003 - 1010
- **Sutherland DR, Eaves CJ, Lansdorp PM, Thacker JD und Hogge DE (1991).** Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells. *Blood* **78**: 666 – 672
- **Sutherland DR, Kreating A, Nayar R, Anania S und Stewart A (1994).** Sensitive detection and enumeration of CD34⁺ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry. *Exp Hematol* **22**: 1003 - 1010
- **Tachimoto H, Bochner BS (2000).** The surface phenotype of human eosinophils. *Chem Immunol* **76**: 45 -62
- **Tao H, Gaudry L, Rice A und Chong B (1999).** Cord blood is better than bone marrow for generating megakaryocytic progenitor cells. *Exp Hematol* **27**: 293 – 301
- **Teofill L, Iovino MS, Sica S, Pierelli L, Menichella G, De Stefano V, Rumi C und Leone G (1994).** Charakterization of peripheral blood CD34⁺ progenitor cells mobilized with chemotherapy and granulocyte colony-stimulation factor. *Exp Hematol* **9**: 477 - 484
- **Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM und Loken MR (1991).** Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34⁺ CD38⁺ progenitor cells. *Blood* **77**: 1218 – 1227
- **Testa U, Fossati C, Samoggia P, Masciulli R, Mariani G, Hassan HJ, Sposi NM, Guerriero R, Rosato V, Gabbianelli M, Pelosi E, Valtieri M und Peschle C (1996).** Expression of Growth factor receptors in unilineage differentiation culture of purified hematopoietic progenitors. *Blood* **88**: 3391 – 3406
- **Uchida N, Flemming WH, Alpern EJ und Wi L (1993):** Heterogeneity of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Immunol* **5**: 177 – 184
- **Uchida N, Weissman IL (1992).** Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1lo Lin- Sca-1+ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J Exp Med* **175**: 175 - 184

- **Udomsakdi C, Lansdorp PM, Hogge DE, Reid DS, Eaves AC und Eaves CJ (1992).** Characterization of primitive hematopoietic cells in normal human peripheral blood. *Blood* **80**: 2513 - 2521
- **Vormoor J, Lapidot T, Pflumio F, Risdon G, Patterson B, Broxmeyer HE und Dick JE (1994).** Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 1994. **83**: 2489 – 2497
- **Wagemaker G, Neelis KJ und Wognum AW (1995).** Surface markers and growth factor receptors of immature hemopoietic stem cell subsets. *Stem Cells* **13**: 165 - 171
- **Whetton AD und Graham GJ (1999).** Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biol.* **9**: 233- 238
- **Weeks SF, Van Bockstaele DR, Plum J, Moulijn A, Rodrigus I, Lardon F, De Smedt M, Nijs, Lenjou M, Loquet P, Berneman ZN und Snoeck HW (1998).** CD34⁺CD38⁻ and CD34⁺CD38⁺ human hematopoietic progenitors from fetal liver, cord blood, and adult bone marrow respond differently to hematopoietic cytokines depending on the ontogenic source. *Exp Hematol* **26**: 1034 - 1042
- **Zaiss M (2001).** CD32-expression is not restricted to granulo-monocytic progenitor cells. (Manuskript in Vorbereitung)
- **Zaiss M und Boyd AW (1997).** A method for single cell PCR allowing multiple amplifications from single haematopoietic progenitor cells.
- **Zandstra PW, Lauffenburger DA und Eaves CJ (2000).** A ligand-receptor signaling threshold model of stem cell differentiation control: a biologically conserved mechanism applicable to hematopoiesis. *Blood* **96**:1215 - 1222
- **Ziegler BL, Müller R, Valtieri M, Lamping CP, Thomas CA, Gabbianelli C, Bühring HJ, Kanz I und Peschle C (1999a).** Unicellular-Unilineage Erythropoietic Cultures: Molecular Analysis of Regulatory Gene Expression at Sibling Cell Level. *Blood* **93**: 3355 - 3368
- **Ziegler BL, Testa U, Condorelli G, Vitelli L, Valtieri M und Peschle C (1998).** Unilineage Hematopoietic Differentiation in Bulk and Single Cell Culture. in „Characteristics and Potentials of Blood Stem Cells“ edited by Fliedner T und Hoelzer D, Alpha Med Press, Mianisburg, USA. *Stem Cells* **16** (1): 51 – 73
- **Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Müller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED und Peschle C (1999).** KDR Receptor: A Key Marker Defining Hematopoietic Stem cells. *Science* **285**: 1553 - 1558

G Abkürzungen

AB-Serum	Humanserum Typ AB
APC	Allopyrocyanin
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BFU-E	burst-forming unit-erythroid
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CCR	Chemokinrezeptor
CD	cluster of designation
cDNA	komplementäre DNA
CFU	colony-forming unit
CFU-E	colony-forming unit-erythroid
CFU-M	colony-forming unit-macrophage
CFU-G	colony-forming unit-granulocyte
CFU-GM	colony-forming unit-granulocyte, macrophage
CFU-GEMM	colony-forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest
EPO	Erythropoietin
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fc	fragment crystalline
FCS	Fötales Kälber-Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward light scatter
gp	Glykoprotein
h	Stunde
Hanks	„Balanced Salt Solution“ (nach Hank)
HLA	Humanes Lymphozytenantigen
IMDM	Iscove`s modified Dulbeccos`s medium
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KDR	Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)
LDL	low density lipoprotein
LSC	laser scanning cytometer
LT	Lymphotoxin
LTC-IC	long-term culture initiating cell
m	milli (10^{-3})

M	Molar
MACS	magnetic activated cell sorting
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
NAG	Natrium-Albumin-Gelatine Puffer
NOD/SCID	non-obese diabetic / severe combined immunodeficiency
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin Chlorophyllprotein - Farbstoff
PHA	Polyhydroxyacetylat
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
r hu	rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
RPMI	Roswell Park Memorial Institut (RPMI 1640: Zellkulturmedium)
RT	Reverse Transkription
s.	siehe

SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	side scatter
TAE	Tris-Essigsäurepuffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thrombopoietin
Tris	(2-Amino-2(hydroxymethyl))1,3-propandiol
U	Unit
u. a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Reinhard Andreesen für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Aufnahme in die Abteilung.

Herrn Prof. Dr. Erwin von Angerer für die Übernahme der erstgutachterlichen Betreuung.

Herrn Dr. Matthias Zaiß und Frau Annegret Rehm für die engagierte Einführung in die Arbeitstechniken, die tatkräftige Unterstützung und die freundschaftliche Atmosphäre.

Allen Mitarbeitern der Abteilung „Hämatologie und Internistische Onkologie“ für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und das ausgezeichnete Arbeitsklima.

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbst verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Christian Hirtreiter

